

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1907-1908

N° 6

LA NUTRITION AZOTÉE DE LA LEVURE

Influence des sels ammoniacaux;
Applications à quelques Levures de Champagne

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme supérieur de pharmacien

Présentée et soutenue le avril 1908

PAR

HENRY BOTTU

Chargé de cours à l'École de Médecine et de Pharmacie de Reims,
Pharmacien de 1^{re} classe,
Interne des Hôpitaux de Paris.

JURY

} MM. RADAIS, Président.
GRIMBERT, Professeur.
DELEPINE, Agrégé.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

1, RUE CASSETTE, 1

—
1908

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1907-1908

N° 6

LA NUTRITION AZOTÉE DE LA LEVURE

Influence des sels ammoniacaux;
Applications à quelques Levures de Champagne

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme supérieur de pharmacien

Présentée et soutenue le avril 1908

PAR

HENRY BOTTU

Chargé de cours à l'École de Médecine et de Pharmacie de Reims,
Pharmacien de 1^{re} classe,
Interne des Hôpitaux de Paris.



JURY

{ MM. RADAIS, Président.
GRIMBERT, Professeur.
DELEPINE, Agrégé.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

1, RUE CASSETTE, 1

1908

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUIGNARD, Directeur, Membre de l'Institut, O. ✱, ☉ I.
BOUCHARDAT, Assesseur, ✱, ☉ I.
E. MUSSON, Secrétaire, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. BOUCHARDAT, ✱, ☉ I. Hydrologie et minéralogie.
GUIGNARD, Membre de l'Institut, O. ✱, ☉ I. Botanique générale.
VILLIERS-MORIAMÉ, ☉ I. Chimie analytique.
BOURQUELOT, ✱, ☉ I. Pharmacie galénique.
GAUTIER, ✱, ☉ I. Chimie minérale.
RADAIS, ☉ I. Cryptogamie.
BÉHAL, ✱, ☉ I. Chimie organique.
PERROT, ☉ I. Matière médicale.
COUTIÈRE, ☉ I. Zoologie.
BERTHELOT, ☉ I. Physique.
GRIMBERT, ☉ I. Chimie biologique.
MOUREU, ✱, ☉ I. Pharmacie chimique.
LEBEAU, ☉ I. Toxicologie.

Professeurs honoraires : MM. MARCHAND, ☉ I. ; RICHE, O. ✱, ☉ I.
JUNGFLEISCH, ✱, ☉ I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET, ☉ I.		MM. GUÉRIN, ☉ I.
DELÉPINE, ☉ I.		GUEGUEN, ☉ I.
TASSILLY, ☉ I.		LUTZ, ☉ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ☉ I. Chimie générale.
COUSIN, ☉ A. Chimie analytique.
PELTRISOT, ☉ A. Micrographie.
MOURLOT, ☉ A. Physique.
BARTHELAT, ☉ I. Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. VALEUR, ☉ A.
Bibliothécaire : M. DORVEAUX, ☉ I.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR M. RADAIS

PROFESSEUR A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE PARIS

A MON MAÎTRE

MONSIEUR E. KAYSER

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DES FERMENTATIONS
A L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE

Avant d'entrer dans le cours de mon sujet, j'adresse, à M. le professeur Guignard, directeur de l'École de pharmacie de Paris, avec mes hommages respectueux, le témoignage de ma plus vive gratitude et à mes Maîtres, l'expression de ma profonde reconnaissance.

A M. le professeur Radais tout d'abord, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la présidence de cette thèse et pour la bienveillante sollicitude avec laquelle il m'a guidé pour l'achèvement de ce travail.

Que M. le professeur Grimbert reçoive tous mes remerciements d'avoir bien voulu faire partie de mon jury.

Je tiens tout particulièrement à remercier M. le professeur Kayser qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire, où sa courtoisie m'a réservé une place aussi agréable qu'instructive, et dont les conseils si autorisés en matière de fermentations m'ont été si précieux au cours de ces recherches.

Je suis heureux de pouvoir adresser ici à M. le professeur Delépine toute ma reconnaissance pour les avis éclairés qu'il m'a souvent donnés et pour l'accueil si bienveillant qu'il m'a toujours témoigné dans nos rapports quotidiens, pendant les trois années que j'ai eu le plaisir d'être son interne.

J'envoie à mes premiers Maîtres de l'Ecole de Reims, MM. les professeurs Henrot, Lajoux et Grandval, qui ne m'ont pas ménagé les preuves de leur sympathique intérêt, depuis l'époque déjà lointaine où, grâce à leur si précieux enseignement, j'acquis mes premières notions scientifiques, le témoignage de ma sincère et très cordiale gratitude.

ABRÉVIATIONS

C. R. Ac. Sc. : Comptes rendus de l'Académie des Sciences.

Ann. de Chim. et de Phys. : Annales de Chimie et de Physique.

Ann. de l'Inst. Pasteur : Annales de l'Institut Pasteur.

Ann. de la Brass. et de la Dist. : Annales de la Brasserie et de la Distillerie.

Centrab. f. Bakt. : Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und infektions Krankheiten.

Ber. der. deutsch. chem. Ges. : Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.

Woch. f. Brauerei : Wochenschrift für Brauerei.

Landw. Jahrbücher : Landwirtschaft Jahrbücher.

Zeitsch. f. d. ges. Brauw. : Zeitschrift für das gesammte Brauwesen.

Zeitsch. f. spir. ind. : Zeitschrift für spiritus industrie.

J. of the fed. inst. of Brewing : Journal of the federated institutes of Brewing.

J. of the chem. Soc. : Journal of the chemical Society.

Poggend. Ann. Annalen der Physik und Chemie (Poggendorfs).

PRÉLIMINAIRES

I. — Historique de la fermentation alcoolique et de l'étude des levures.

La préparation des boissons fermentées remonte à la plus haute antiquité.

Depuis les temps les plus reculés, l'homme connaissait la fabrication du vin par l'écrasement du raisin, celle du vin d'orge, de l'hydromel, au point que, à l'origine de toutes les grandes civilisations, on trouve une divinité symbolisant ces boissons fermentées, telle Bacchus chez les Grecs.

Par contre, il faut arriver jusqu'aux temps modernes pour trouver quelques observations sur la nature et la cause de ce bouillonnement (*fervere*, fermentation).

VAN HELMONT¹ constate la fermentation d'un gaz spécial dans l'effervescence produite par la fermentation et cherche à la différencier des divers phénomènes d'effervescence. Il sépare celle que l'on constate dans le moût de raisin de celles due à l'action des acides sur les bases.

Avec LAVOISIER², nous entrons sur le terrain scientifique par son explication géniale de la fermentation alcoolique, due au dédoublement du sucre en alcool et en acide carbonique.

Le premier auteur qui recherche quelle peut être la cause de la fermentation est LEUWENHOEK³ qui, en 1680, examinant au microscope les dépôts formés dans les liqueurs fermentées, les trouve constitués par des amas de globules ovoïdes et sphériques.

THENARD⁴, en 1803, montre l'analogie qui existe comme propriétés et aspects, entre les dépôts des divers jus sucrés fermentés et ceux formés par la levure de bière. L'apparition spontanée de la fermentation

1. VAN HELMONT : Observations de Van Helmont dans les *Œuvres de Lavoisier*, 1864, t. 1, p. 448 (Tractatus de Flatibus, n° 67).

2. LAVOISIER : *Œuvres de Lavoisier*, 1864, t. 1, p. 100.

3. LEUWENHOEK : Voir *Gärungschemie* de A. Mayer, 6^e édit., Heidelberg, 1906, p. 40.

4. THENARD : *Ann. de Chim.*, 1803 [1], t. 46, p. 294.

attire son attention ainsi que celle de GAY-LUSSAC¹, mais tous deux s'efforcent en vain de l'expliquer,

ASTIER² affirme que l'air sert de véhicule à certains germes, parmi lesquels le ferment alcoolique qu'il considère comme appartenant au règne animal.

C'est en 1835 que le premier grand pas de l'interprétation de ce phénomène fut franchi par CAGNIARD DE LATOUR³ en France et presque au même moment par SCHWANN⁴ en Allemagne. Ils constatèrent les premiers que le dépôt des cuves de moût de bière en fermentation, appelé levure, était formé par un amas de cellules végétales vivantes, qui se multipliaient par bourgeonnement.

Cependant, ces deux auteurs, tout en soupçonnant le rapport intime qui devait exister entre le départ des sucres des divers moûts que l'on faisait fermenter avec cette végétation cellulaire, laissèrent à PASTEUR⁵ la gloire de donner l'explication complète du phénomène si important de la fermentation alcoolique.

Celui-ci commence ses expériences en 1860 et les clôture par l'affirmation de la levure de bière comme ferment de la fermentation alcoolique, conclusion qui anéantissait du coup toutes les théories existantes jusque-là. D'abord celle de LIEBIG⁶ qui trouvait l'explication de la fermentation dans l'altération des matières azotées albuminoïdes au contact de l'oxygène considéré comme le *primum movens* de la fermentation.

Puis celle de BERZÉLIUS⁷ et de MITSCHERLICH⁸, qui comprenaient la fermentation alcoolique en la classant parmi les phénomènes dus à des actions de contact, le ferment étant une matière albuminoïde pourvue d'une action catalytique.

Enfin, celle de FREMY⁹, qui émettait l'hypothèse de la transformation de la matière albumineuse en grains de levure sous l'action d'une force vitale qui lui serait propre.

II. — État naturel de la levure.

La levure est un organisme qui a contribué depuis longtemps aux diverses fermentations spontanées qui ont produit les premières boissons fermentées connues.

1. GAY-LUSSAC : *Ann. de Chim.*, 1810 [1], t. 76, p. 245.

2. ASTIER : *Les levures*, par KATSER, 2^e édit., p. 43.

3. CAGNIARD DE LATOUR. *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1838 [2], t. 68, p. 206.

4. SCHWANN : *Poggend. Ann.*, 1837, t. 417, p. 484.

5. PASTEUR : *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1860 [3], t. 58, p. 364.

6. LIEBIG : *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1839 [2], t. 71, p. 147.

7. BERZÉLIUS : *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1836 [2], t. 61, p. 146.

8. MITSCHERLICH : *Poggend. Ann.*, 1843, t. 435, p. 94.

9. FREMY : *Sur la génération des ferments*, 1875, p. 93.

L'emploi des levains est mentionné dans les livres des Hébreux. L'origine, l'habitat, la répartition, la dissémination, la conservation des levures naturelles ont été l'objet de nombreux travaux.

C'est PASTEUR¹ qui, le premier, énonça d'abord que les levures étaient apportées avec le raisin. Puis, plus tard, en collaboration avec CHAMBERLAND², ces deux savants montrèrent que les levures existent au moment de la maturité du raisin sur la vigne, surtout sur le bois de la grappe et la pellicule des grains de raisin et qu'elles sont très peu fréquentes aux époques qui précèdent ou suivent la maturité. Aux autres moments, elles se trouvent dans le sol, comme l'a démontré HANSEN³, qui les a trouvées dans le sol, en Danemark, en Allemagne, en Suisse, en Italie, sur les Alpes, pays soumis à des climats très différents. Partout il a constaté la présence de la levure dans le sol, où elle passe, dès lors, la plus grande partie de l'année, pour être transportée de là sur les raisins à l'époque de leur maturité.

Pour BERLÈSE⁴, le moyen de transport le plus actif n'est pas l'air, mais surtout les insectes qui déposent les ferments alcooliques sur les raisins avec leurs excréments. CORDIER⁵ prétend, au contraire, et tout au moins en Champagne, que la dissémination de levures se fait beaucoup plus au moyen de l'air que par l'intermédiaire des insectes. Enfin, BOUTROUX⁶ attribue à ces derniers un rôle beaucoup plus actif que celui que peuvent remplir, en la circonstance, les mouvements de l'air.

III. — Physiologie essentielle de la levure.

Pour donner de suite une idée précise de la levure, on doit dire qu'il y a deux ordres de faits tout à fait distincts dans la vie de la levure : la fermentation et la multiplication. Cette donnée, qui serait peut-être mieux à sa place au début du chapitre traitant de la nutrition des levures de champagne, doit faire considérer la fermentation alcoolique normale comme le résultat de la superposition de deux modes d'existence de la levure qui vit, d'une part, comme un végétal et, d'autre part, comme un ferment.

Comme l'ont montré LECHARTIER et BELLAMY⁷, puis M. MÜNTZ⁸, et

1. PASTEUR : *Etudes sur la bière*, 1876, p. 141.
2. CHAMBERLAND : *Annales scientifiques de l'Ecole normale supérieure*, 1878. Suppl. t. 7, p. 71.
3. HANSEN : *Meddelser fra Carlsberg Laboratoriet*, 1881, t. 1, p. 159.
4. BERLÈSE ; *Centralb. f. Bakt.*, 1897 [2], t. 3, p. 592.
5. CORDIER : *C. R. Ac. Sc.*, 1898, t. 127, p. 628.
6. BOUTROUX : *C. R. Ac. Sc.*, 1898, t. 127, p. 1033.
7. LECHARTIER et BELLAMY : *C. R. Ac. Sc.*, 1872, t. 75, p. 106.
8. MÜNTZ : *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1878 [5], t. 13, p. 543.

récemment MM. MATRUCHOT et MOLLIARD¹ qui ont fait une démonstration définitive et rigoureuse de ce phénomène, le pouvoir de scinder certains sucres en CO_2 et alcool n'appartient pas exclusivement à la levure, mais doit être considéré comme propre à toute cellule végétale. La fermentation alcoolique peut exister dans tout végétal, en l'absence de tout organisme étranger; c'est ce qu'on appelle la fermentation propre.

Si la levure est considérée comme le type des ferments alcooliques, c'est qu'elle est mieux adaptée à cette faculté biologique. Comme végétal, elle se multiplie, donne naissance à des cellules nouvelles; comme ferment, elle dédouble le sucre.

A ceci, il faut ajouter, pour définir en quelques mots la physiologie de la levure, la conception de DUCLAUX², qui en rétablit ainsi l'unité de vie, considérée auparavant sous deux aspects vitaux, inconciliables : vie aérobie, vie anaérobie.

« Dans quelque situation qu'elle soit, la levure produit constamment de la zymase et de l'alcool, mais cet alcool apparaît dans le liquide quand l'oxygène fait défaut et il est brûlé peu à peu au fur et mesure de sa production, lorsque la levure est au large contact de l'air; en réalité, la levure n'est ni un végétal aérobie ni un végétal anaérobie : elle a un caractère intermédiaire. Il lui faut très peu d'air, mais il lui en faut.

La levure diffère encore de beaucoup d'autres végétaux, en ce qu'elle peut s'accommoder mieux d'un certain changement dans les conditions où on la fait vivre et manifester alors des phénomènes nouveaux.

La consommation de matière alimentaire qui se fait pendant une culture correspond à une double dépense : la dépense de construction des nouvelles cellules, la dépense d'entretien des cellules déjà formées. »

IV. — Historique de l'étude des levures de vin et de celles de Champagne en particulier.

La séparation des levures est un problème délicat, d'autant mieux que rien ne garantit que les propriétés d'une espèce soient immuables.

D'autre part, comme le dit DUCLAUX³, les caractères distinctifs seront parfois délicats et ne peuvent résulter que des comparaisons très attentives entre les propriétés morphologiques et physiologiques.

1. MATRUCHOT et MOLLIARD : *Revue générale de botanique*, 1903, t. 15, p. 193.

2. DUCLAUX : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1899, t. 2, p. 483.

3. DUCLAUX : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1899, t. 2, p. 484.

Comme d'ailleurs ces caractères, lorsqu'on les pousse dans le détail, arrivent d'ordinaire à perdre leur permanence, à disparaître dans certains cas pour reparaitre dans d'autres, de sorte qu'ils sont flottants, on ne peut compter sur eux. Ceci montre combien il sera difficile d'établir une classification de levures. Celle-ci serait d'autant plus naturelle que les caractères étudiés et cités pour chaque levure seraient plus essentiels.

Bien que ce ne soit pas une classification rigoureuse, on peut diviser les levures alcooliques en levures de bières et levures de fruits.

Parmi ces dernières, il en existe un grand nombre que l'on peut qualifier spécialement de levures de vin. Pour en donner une définition plus précise, il est évident tout d'abord que les levures de vin se rencontrent plus spécialement sur les raisins, dans les moûts de vin et dans les lies. En outre, elles semblent se distinguer des autres levures alcooliques par leur résistance plus marquée à l'acidité, leur grande sensibilité à l'alcalinité, un optimum de température correspondant au degré le plus favorable à leur activité. Enfin par leur facilité de faire disparaître de plus fortes quantités de sucre dans les moûts et de produire beaucoup d'acides volatils. De plus, pendant la fermentation, elles se reconnaissent à cette odeur vineuse plus ou moins différenciée en ce que l'on appelle le bouquet, qu'elles communiquent aux différents milieux naturels ou artificiels qu'elles sont susceptibles de faire fermenter. La levure n'est pas évidemment le seul facteur qui intervient dans la formation du bouquet des vins, mais elle y contribue pour une large part. Une autre vient de cette action encore mal connue de la fermentation sur des substances indéterminées, glucosides ou autres principes immédiats des moûts. Enfin, les nombreuses réactions chimiques intimes des constituants du vin, éthérification, oxydation, etc., doivent participer aussi à la production de ces parfums qui déterminent, non seulement les différentes sortes de vins (Bordeaux, Bourgogne, Champagne), mais qui permettent à des dégustateurs de reconnaître tel ou tel cru de ces diverses régions vinicoles.

La propriété spécifique de sécréter le parfum est inhérente au globe de levure. Cette propriété est durable et peut se perpétuer pendant des années, même chez des levures conservées dans les laboratoires et qui, une fois isolées, n'ont plus jamais séjourné dans le sol, comme l'ont montré de nombreuses expériences, telles que celles de LOUIS MARX¹, ROMMIER², JACQUEMIN³, KAYSER et BARBA⁴, pour ne citer que les travaux faits en France sur ce sujet.

1. MARX : *Moniteur scientifique du Dr Quesneville*, 1888, t. 2, p. 1273.

2. ROMMIER : *C. R. Ac. Sc.*, 1884, t. 98, p. 1594; 1884, t. 99, p. 879; 1891, t. 113, p. 386.

3. JACQUEMIN : *C. R. Ac. Sc.*, 1888, t. 106, p. 643; 1890, t. 110, 1140.

4. KAYSER et BARBA : *Bulletin du ministère de l'Agriculture*, 1896, t. 15, p. 428 et 544.

Il est certain, toutefois, que cette propriété n'est pas indéfinie, du moins dans les conditions essentiellement variables où agit la nature. S'il s'est créé avec les siècles des races produisant ici le parfum du bordeaux, là celui du champagne, ailleurs celui du bourgogne avec leurs variétés régionales et locales constantes, c'est que ces races ont rencontré dans la composition chimique du sol, dans les doses annuelles et saisonnières d'humidité, de chaleur, de lumière solaire, des conditions favorables, qu'elles ont accoutumées à leur évolution et qui se sont ainsi fixées par sélection dans la région, dans le cru.

Si les recherches faites jusqu'à ce jour étaient assez nombreuses pour pouvoir dresser une nomenclature de toutes les levures de vin sur cette base de classement, il serait dès lors très facile d'en faire un exposé historique, mais pour l'instant les documents sur ce sujet sont encore peu nombreux et dès lors insuffisants.

Au début des recherches sur les ferments alcooliques des moûts de raisins, les diverses races de *Saccharomyces* isolées furent décrites et classées en les rapportant aux différentes formes types des globules. C'est ainsi que la forme en ellipse fut représentée par le *Saccharomyces ellipsoideus* de REES¹, par le *S. ellipsoideus* de HANSEN² trouvé sur des raisins des Vosges, puis par la levure ordinaire du vin de PASTEUR³.

La forme en citron se retrouve dans le *S. apiculatus* de REES, considéré par cet auteur comme fonctionnant surtout au début des fermentations, dans le *S. apiculatus* de HANSEN, qui servit à ce savant à démontrer que les levures passent un stade de leur existence dans le sol.

La forme allongée est représentée par le *S. Pastorianus*, que REES signale comme succédant à la levure apiculée dans les fermentations vinaires et par le *S. maxianus*, nom donné par HANSEN, à une levure trouvée sur des raisins par L. MARX. La forme ronde se retrouve dans *S. conglomeratus* de REES.

Ces diverses espèces ou variétés sont pour ainsi dire des types historiques, car il était à prévoir que bientôt des races de levures reconnues pures, bien qu'ayant les mêmes formes morphologiques, mais très différentes physiologiquement, ne tarderaient pas à être signalées par les divers auteurs.

Ceux qui en France ont donné les travaux les plus importants, sont

1. REES : *Botanische. Unters. uber die. Alk. Gährungspilze*. Leipzig, 1870, p. 26.

2. HANSEN : *Meddelser fra Carlsberg Laboratoriet*, 1881, t. 1, p. 159.

3. PASTEUR : *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1860 [3], t. 58, p. 364 et *Etudes sur le vin*, 2^e édit., Paris, 1873, p. 48.

LOUIS MARX¹ qui a différencié d'après la forme des globules et le temps de formation des spores :

14	levures d'une lie d'un vin d'Epernay.
14	— — — de Clos-Vougeot.
15	— — — du Libournais.
15	— — — du Bordelais.

Il les a, de plus, expérimentés sur des moûts stérilisés et a obtenu d'excellents résultats. Il termine son mémoire en donnant le moyen de les conserver de façon à les avoir pour les années suivantes.

ROMMIER², après quelques essais préliminaires, arrive finalement à des résultats concluants en amorçant des cuvées de la Dordogne avec du moût de Saint-Emilion, dans la proportion de 1/40. Il obtient un vin ayant absolument le bouquet de Saint-Émilion et un ensemble de qualités extraordinaires.

JACQUEMIN³, dans ses premières expériences emploie un *S. ellipsoideus* qui donne au moût d'orge tartrique un caractère de vinosité franche. Cette levure de vin, qui a servi pendant dix-huit mois à faire du vin d'orge, a présenté la plus grande stabilité. Il ajoute que c'est un genre de ferment alcoolique, tout à fait distinct de la levure de bière. Dans des expériences suivantes, il a utilisé des levures propres aux raisins de Beaune, Ay, Chablis, Riquewyhr (Alsace).

MARTINAND⁴ a cherché à différencier le *S. ellipsoideus* provenant des vins de Bourgogne, Bordeaux, Epernay, par la formation d'ascospores et la quantité de maltose qu'elles font disparaître comparativement avec divers *S. apiculatus*, *pastorianus*, *cerevisie*.

PERRAUD⁵, à la station œnologique de Villefranche (Rhône) parmi de nombreux essais sur l'application des levures sélectionnées à la vinification, a pu constater, dans une expérience avec une levure de Bourgogne et une levure du Beaujolais que le vin obtenu avec le premier était velouté, brillant, fin et bouqueté, que celui ayant fermenté avec la seconde était étoffé et parfumé; le témoin était vert et plat.

ROESER⁶ pour étudier la formation d'aldéhyde dans la fermentation alcoolique a ensemencé du moût de raisin filtré à la bougie Chamberland avec divers races de levures pures dont une levure de Champagne, une de Santenay, de Vougeot, de Thann, de Saint-Emilion, de Jurançon, de Tokay, d'Algérie.

MM. MARTINAND et RIETSCH⁷ recherchant les microorganismes suscep-

1. L. MARX : *Moniteur scientifique du Dr Quesneville*, 1888, t. 2, p. 1273.

2. ROMMIER : *C. R. Ac. Sc.*, 1890, t. 110, p. 1140.

3. JACQUEMIN : *C. R. Ac. Sc.*, 1888, t. 106, p. 643; 1890, t. 110, p. 1140.

4. MARTINAND : *C. R. Ac. Sc.*, 1888, t. 107, p. 745.

5. PERRAUD : Voir *Les levures*, par E. KATSER, 2^e édit., Paris, 1903, p. 191.

6. ROESER : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1893, t. 7, p. 41.

7. MARTINAND et RIETSCH : *C. R. Ac. Sc.*, 1891, t. 112, p. 736.

tibles de se développer en milieu acide ont trouvé qu'il en existe un nombre très variable. Parmi les *Saccharomyces*, les *S. apiculatus* sont bien plus nombreux que les *S. ellipsoideus*. Ces auteurs ont ensuite confirmé que la fermentation spontanée du raisin est ordinairement produite pendant les quarante-huit premières heures par le *S. apiculatus*, qui cèdent ensuite la place aux *S. ellipsoideus* sans cependant disparaître complètement.

Dans de nombreuses expériences exécutées sur du moût de raisins secs avec des cultures pures de levures, MM. RIETSCH et HERSELIN¹ ont obtenu un moindre rendement en alcool pour la même quantité de sucre réducteur détruite, avec les levures apiculées comparées aux levures elliptiques. Parmi ces dernières, celles qui furent expérimentées par eux étaient des levures de Saint-Emilion, Ermitage, Chambertin, Richebourg, Juliennas, Bourgogne, Sauternes, Steinberg, Chablis, Chambertin, Cramant.

M. KAYSER² a fait sur des levures de vin d'origines très variées de très nombreux travaux. Certains étaient dirigés vers un but plutôt théorique tel que celui de la contribution à l'étude des levures de vin où il a employé des levures de Champagne, du Midi, de Saint-Emilion, d'Espagne, de Portugal. D'autres visaient davantage le côté pratique intéressant, tel que le rapport sur la station œnologique du Gard fait en collaboration avec M. BARBA³. Au début de leurs recherches, ces auteurs ont identifié quinze levures du Gard, et dans une seconde partie ils les ont différenciées avec des levures de Champagne, Autriche, Tokay, Saint-Emilion, Clos-Vougeot, Espagne.

Plus tard, ils ont poursuivi leurs expériences par des essais de vinification sur des moûts de la région du Gard, préalablement pasteurisés, qu'ilsensemencèrent avec des levures pures sélectionnées.

Les vins obtenus ainsi furent comparés, au moyen de l'analyse et de la dégustation, avec ceux provenant des mêmes moûts ayant fermenté avec leurs levures indigènes. Les levures utilisées étaient des levures de Champagne, Sauternes, Saint-Emilion, Algérie, Gard, Espagne.

MM. DOYEN et ROUSSEL⁴ dans leurs descriptions des divers micro-organismes, disent dans leur chapitre réservé aux *Saccharomyces* que la plupart des levures de vin sont morphologiquement assez semblables aux levures de bière. Toutefois leur diamètre est généralement plus petit et leur forme plus irrégulière. Ils ajoutent que presque toutes les levures de vin sont des levures basses, et font figurer dans ce même chapitre de leur livre une levure de vin de Champagne et deux levures

1. RIETSCH et HERSELIN : *C. R. Ac. Sc.*, 1895, t. 121, p. 378.

2. KAYSER : *Bulletin du ministère de l'Agriculture*, 1896, t. 15, p. 97.

3. KAYSER et BARBA : *Bulletin du ministère de l'Agriculture*, 1896, t. 15, p. 428 et 544.

4. DOYEN et ROUSSEL : *Atlas de microbiologie*, 1897, p. 212.

apiculées provenant l'une d'un moût de Bouzy, l'autre d'un moût d'Ay.

M. DESCOFFRES¹ dans une étude sur les levures œnogènes des Charentes a pu constater l'existence de races différentes correspondant à autant de crus.

Il les ramène toutes à plusieurs types dont :

Le *Saccharomyces ellipsoideus campaniensis* I.

Le *Saccharomyces ellipsoideus campaniensis* II.

Le *Saccharomyces apiculatus campaniensis*.

Des travaux analogues exécutés dans ce même genre d'idées ont été faits à l'étranger, et parmi eux il faut citer ceux de MULLER-THURGAU² et de CHUARD³ en Suisse; de WORDMANN⁴ et de MEISSNER⁵ qui ont spécialement étudié les levures des vins du Rhin, de la Moselle, de l'Aar et du Neckar; ceux de NATHAN⁶ dans le Wurtemberg, de KOSUTANY⁷ sur les levures de Hongrie; ceux de PIETRI⁸, de PICHI⁹, de FORTI¹⁰ sur les nombreuses levures d'Italie; enfin les communications de MACH et PORTELE¹¹.

Quant à l'historique bibliographique spéciale des levures de Champagne, en outre des différents auteurs précédemment cités, il comporte des travaux intéressants dont le premier en date est celui de LOUIS MARX¹², en 1888, qui le fit en appliquant aux levures de vin les données de HANSEN sur les levures de bière.

Néanmoins il ne donne aucun nom aux levures de ses cultures, disant que les dénominations de *cerevisia*, *pastorianus*, *ellipsoideus* ne sont que des noms incertains et douteux. Il fait connaître la forme, dit si elles sont égales ou irrégulières dans leurs dimensions. Il donne alors comme résultat de ses travaux sur une lie d'Epernay, que la forme de la levure est elliptique et ronde; en général assez égale, que les spores à la température de 24-25° se forment en moins de vingt-quatre heures et en trois jours à 10-12°.

NASTUKOFF¹³ s'est servi d'une levure de Champagne pour mesurer le pouvoir réducteur des *Saccharomyces*, et cette levure a été reconnue comme ayant le pouvoir réducteur le plus fort.

1. DESCOFFRES : Thèse Doctorat en Pharmacie, Bordeaux, 1904, p. 51.

2. MULLER-THURGAU : Zeitsch. f. d. ges. Brauw., 1890, t. 25, p. 577.

3. CHUARD : Chronique agricole du canton de Vaud, Lausanne, 25 juin, 1892.

4. WORDMANN : Landw. Jahrbücher, 1892, t. 21, p. 901.

5. MEISSNER : Landw. Jahrbücher, 1898, t. 27, p. 715.

6. NATHAN : Gartenflora, 1891, p. 267.

7. KOSUTANY : Landw. Versuchstationen, 1892, t. 40, p. 217.

8. PIETRI : Ann. d. Scuola Enolog. in Conegliano, t. 1, p. 1.

9. PICHI : Nuova Rassegna di viticola ed enologia, 1892, p. 210.

10. FORTI : Staz. sperim. agrar. italiane, 1891, t. 21, p. 241.

11. MACH et PORTELE : Landw. Jahrbücher, 1892, t. 46, p. 233.

12. LOUIS MARX : Moniteur scientifique du Dr Quesneville, 1888 [4°], t. 2, p. 1273.

13. NASTUKOFF : Ann. de l'Inst. Pasteur, 1895, t. 9, p. 766.

LABORDE¹ expérimenta des levures de Champagne dans son étude de la variation de l'azote ammoniacal du moût à l'azote ammoniacal du vin.

MM. KAYSER et BARBA² utilisèrent une levure de Champagne dans leurs expériences sur l'ensemencement des levures pures dans les moûts de raisins stérilisés ou pasteurisés.

LAURENT³ a essayé une levure basse de Champagne dans ses recherches sur la valeur comparative des nitrates et des sels ammoniacaux comme aliment de la levure de bière et de quelques autres plantes.

Mais un des travaux les plus importants qui fut fait sur la question est la thèse de CORDIER⁴ : *Recherches sur les levures du vignoble de Champagne*. Pour n'en tirer que ce qui intéresse directement ce sujet, je relaterai ce que dit CORDIER après qu'il eut exécuté diverses expériences sur des moûts provenant d'Avize, Ay, Bouzy, Verzenay, Villemommange (grands crus champenois). Il s'est aperçu très rapidement, dit-il, qu'une race probablement unique de *Saccharomyces ellipsoideus* tient le rôle principal dans la fermentation des moûts de Champagne.

Voici quels sont les principaux caractères de la levure principale donnés par cet auteur :

1° Sur gélatine au moût de raisin : colonies en perles saillantes très blanches qui se colorent en brun après une longue exposition à l'air et à la lumière, s'enlèvent facilement et se dissocient de même dans une goutte d'eau.

2° Dans le moût, elle le trouble à peine ; celui-ci s'éclaircit rapidement ; elle tombe au fond comme un précipité lourd sans s'attacher aux parois ; elle ne forme pas de voile ni de réseaux mucilagineux.

Elle apparaît au microscope sous forme de grosses cellules elliptiques et presque rondes assemblées par trois ou quatre. Les globules présentent souvent une grosse vacuole, ils deviennent ronds et épaississent leurs parois en vieillissant.

Elle donne des spores en soixante-dix heures à 22°. Les autres races isolées, très voisines, n'en diffèrent que par l'état physique des dépôts laissés au fond des vases. Les cultures sur gélatine sont plus étalées, plus poisseuses, plus adhérentes. Les globules s'attachent aux parois des vases en donnant un enduit légèrement gras et fournissent des petits grumeaux caséeux. Les levures exhalent une odeur moins vanillée, plus butyrique. Plus tard, CORDIER⁵ modifia ces premières

1. LABORDE : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1898, t. 1, p. 388 et 412.

2. KAYSER et BARBA : *Bulletin du ministère de l'Agriculture*, 1896, t. 15, p. 428 et 544.

3. LAURENT : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1889, t. 3, p. 362.

4. CORDIER : *Thèse Doctorat en Pharmacie*, Paris, 1899, p. 41.

5. CORDIER : *Revue de Viticulture*, 1906, p. 125.

données en disant que le cru fameux d'Aÿ offre au moins deux races de *Saccharomyces* dérivées du type classique de Champagne, jouant le rôle principal dans la fermentation des moûts, voisines, il est vrai, mais cependant suffisamment distinctes.

V. — Plan du travail.

Dans la première partie de cette étude, j'ai relaté mes recherches sur l'isolement à l'état de pureté absolue de cinq levures isolées de moûts, provenant de raisins de Champagne des meilleurs crus. Ce résultat obtenu je l'ai complété par la différenciation de chacune, me basant non seulement sur des caractères de morphologie, mais aussi sur les aptitudes biologiques et physiologiques de ces cinq levures.

J'ai détaché de cette dernière étude, pour en constituer le second chapitre de ma thèse, quelques expériences relatives à l'action des différents composés azotés comme aliments des ferments alcooliques. Les résultats obtenus avec les cinq levures de Champagne sont en parfaite concordance avec les données fournies par les travaux précédents sur l'alimentation de la levure. Ne sortant pas de ce sujet, dans un troisième chapitre, j'ai essayé l'influence particulière des sels ammoniacaux.

Je crois en cela présenter quelques faits nouveaux qui peuvent apporter ainsi une légère contribution à la question si importante de la nutrition azotée de la levure.

Cette question de l'alimentation azotée de la levure dans la fermentation alcoolique mise à l'étude depuis PASTEUR, malgré les importants travaux de ce maître et de ceux que publièrent dans la suite, de nombreux biologistes, tels que DUCLAUX, LAURENT, LABORDE, HAYDUCK, STERN, etc., était jusqu'en 1903 si peu au point, que M. FERNBACH dans les *Annales de la Brasserie et de la Distillerie* pouvait écrire à cette époque que cette question était de plus en plus confuse.

Elle a fait dans ses dernières années un très grand pas, grâce tout particulièrement aux remarquables expériences de MM. EHRLICH et PRINGSHEIM.

Pour terminer, en plus de l'énumération succincte des conclusions principales qui ressortent de mes recherches, j'ai cru intéressant d'ajouter dans le quatrième et dernier chapitre les faits d'ordre pratique dans lesquels je pouvais en trouver une application directe.

Après avoir exposé succinctement la manutention si spéciale et cependant si délicate, minutieuse et longue des vins mousseux de Champagne, j'ai fait suivre ce résumé de quelques considérations

suggérées par mes résultats sur la pratique industrielle vinicole champenoise. Elles ont aussi bien rapport aux qualités physiques, chimiques et biologiques des cinq levures qu'à l'étude des aliments azotés et des sels ammoniacaux, dans la fermentation alcoolique et la vinification à un point de vue général.

CHAPITRE PREMIER

ISOLEMENT ET DIFFÉRENCIATION DES LEVURES DE CHAMPAGNE

I. — Technique pour l'isolement des levures.

J'ai employé pour isoler les levures, un procédé reposant sur le principe de la méthode classique due à HANSEN ¹. Il n'est pas superflu de rappeler que c'est cet auteur qui donna le premier une méthode exacte de sélection et établit avec certitude ce que PASTEUR avait déjà présumé, que les levures étaient un mélange de diverses espèces.

Avant HANSEN on n'était pas parvenu à diviser entre elles les cellules d'une même levure et à obtenir des cultures réellement pures, car une culture pure doit non seulement être exempte de moisissures, mycodermes et bactéries, mais aussi provenir d'une race unique, provenant d'une même cellule-mère.

Voici en quelques mots la technique suivie :

Une goutte d'une lie d'une des meilleures cuvées de tel cru, est diluée dans 50 cm³ d'eau distillée stérilisée, un fil de platine trempé dans cette dilution est piqué dans du moût gélatiné.

Parmi les nombreuses colonies qui se développent sur ce milieu solide, celles encore jeunes, qui présentent le plus de régularité et qui se trouvent nettement isolées, sontensemencées dans un milieu nutritif. Celui que j'ai pris dans la plupart de mes expériences est la décoction de touraillon saccharosé et glucosé. Pour d'autres essais où les résultats obtenus, en dehors de leur intérêt scientifique, pouvaient avoir une portée pratique en vinification et où, dès lors, le milieu naturel des levures s'imposait, j'ai employé le moût de raisins champenois, stérilisé à l'autoclave à 110-115°, ou filtré à la bougie Chamberland (bougie B).

Pour continuer le sélectionnement des diverses espèces, une goutte de ce premier moût fermenté fut de nouveau diluée dans de l'eau distillée stérilisée.

1. HANSEN : *Meldelser fra Carlsberg Laboratoriet*, 1886, t. 2, p. 92.

Des traces de cette dilution furent alors étendues au fil de platine sur milieu solide, et les colonies en provenant ensemencées dans du bouillon de touraillon sucré.

Après quatre ou cinq passages successifs sur gélatine, on obtient une culture de levure pure dans la plupart des cas.

Pour se rendre compte de la pureté d'une culture, le premier moyen est l'examen microscopique direct.

La levure doit alors présenter en général, à l'état jeune, des cellules de même forme, même dimension, même aspect. Dans une préparation obtenue par fixation et coloration à la solution de ZIEHL, il ne doit pas se trouver de bactéries qui dans le cas contraire apparaissent colorées en rouge intense.

A ce propos, je signalerai ici la grosse difficulté qu'offrent certaines levures en grumeaux pour leur isolement à l'état pur et tout particulièrement dans le cas fréquent où elles sont infectées de bactéries. Ce dernier fait s'est présenté dans mon étude avec la levure V, dont les cultures restaient toujours impures, malgré des passages nombreux sur moût gélatiné et moût gélosé.

C'est en prenant un procédé un peu compliqué que je suis parvenu à la purifier. D'abord, ensemencement par accoutumance progressive dans un milieu très acide. De là, passage dans un moût porté à 50° pendant dix minutes (cette levure résiste assez bien à la chaleur). Enfin, broyage du dépôt de levure ainsi traitée dans un mortier avec du sable. Finalement, dilution du produit de la trituration dans de l'eau stérile et passages successifs sur moût gélatiné et bouillon de touraillon.

Pour diriger mes premières recherches sur la sélection des levures de champagne, j'ai voulu tenir compte de la distribution géographique de son vignoble, en même temps que de la réputation de ses différents crus.

En effet, les divers lieux d'origine des levures représentent chacun un des grands crus des trois fameuses régions vinicoles de la Champagne. Ce sont elles qui fournissent les vins les plus renommés et dont le bouquet spécial et propre à chacun est indispensable pour la composition des cuvées parfaites.

On considère, en effet, en Champagne, la région dite Montagne de Reims avec crus renommés (Verzenay, Verzy), la région dite Vallée de Marne avec crus renommés (Ay, Bouzy), la région dite Côte d'Avize avec crus renommés (Mesnil-sur-Oger, Cramant). Un vin parfait est constitué par le mélange de plusieurs crus; de cette opération tout à fait spéciale à la pratique vinicole champenoise et appelée assemblage, résulte une cuvée.

C'est d'une des meilleures cuvées, provenant de l'une des plus importantes maisons de champagne, que j'ai isolé une autre levure.

Dans mon étude, j'ai obtenu des formes constantes et presque

typiques, mais c'est que je me suis toujours placé dans les conditions que recommande HANSEN¹ pour faire ce genre d'examen. Il est essentiel, en effet, de prendre un même et bon milieu de culture (bouillon de touraillon très limpide et peu foncé, sucré à 5 gr. % environ) moût de raisin parfaitement clair, peu sucré, d'une acidité faible et constante. Il faut en outre opérer à une température optima vers 25-27° et observer les cultures au même âge (quarante-huit heures après ensemencement). Chaque levure a été examinée dans ces conditions dans des cultures sur bouillon de touraillon et sur moût de raisin.

Leur aspect microscopique et même macroscopique est différent selon qu'on les examine dans l'un ou l'autre de ces deux liquides.

Le premier présente pour cette étude une réelle supériorité sur le second. En effet, toutes les levures s'y développent, y fermentent avec rapidité et s'y conservent très bien. De plus, elles y gardent beaucoup plus longtemps que dans le moût de raisin leurs caractères de jeunesse, or ce sont du reste les seuls à considérer au point de vue de la différenciation morphologique des levures; celle-ci est également beaucoup plus nette dans ce milieu que dans tous les autres.

Le bouillon de touraillon a encore l'avantage de se préparer à toute époque de l'année; on peut l'obtenir très clair et le sucrer à volonté. Il présente une réaction acide très faible, qui varie très peu. Cette remarque est en effet très importante, car le facteur acidité, si variable dans des mouts de raisin d'origine différente, a une influence énorme sur l'aspect des levures.

II. — Caractères morphologiques.

C'est de propos délibéré que j'ai mis de côté les caractères cytologiques de ces cinq levures; malgré les progrès acquis récemment dans nos connaissances sur le sujet, cette étude ne pouvait apporter un appoint pratique à leur différenciation. Si, par contre, je me suis étendu sur la morphologie externe, c'est que j'ai pensé que dans des recherches sur l'identification d'une levure, la multiplicité des documents, dans un examen microscopique par exemple, peuvent être très utiles.

Au sujet de la forme des cellules de levures, certains auteurs tels que MARX² n'accordent pas à cet examen grande confiance. C'est ainsi qu'il dit que dans une espèce cultivée dans du moût de bière, on rencontre presque toujours les trois formes rondes, elliptiques, ovales, souvent allongées, longues, en forme de boudin, quelquefois même une forme unique et qui sont toutes de même dimension.

1. HANSEN : *Meddelser fra Carlsberg Laboratoriet*, 1900, t. 5, p. 9.

2. MARX : *Moniteur scientifique du Dr Quesneville*, 1888 [4], t. 2, p. 1274.

EXAMEN MICROSCOPIQUE

Levure I. — Le dépôt d'où elle fut isolée venait d'un moût d'Ay-Champagne.

Examinée dans du bouillon de touraillon on remarque généralement que les cellules sont isolées les unes des autres. Dans les cultures jeunes, la forme principale est celle d'une poire allongée. Exceptionnellement, on rencontre quelques globules allongés en cylindroïdes et quelques-uns se raccourcissent et prennent la forme ovoïde arrondie.

Dans les cultures âgées, c'est la forme allongée qui prédomine ; jamais on ne voit de cellules même vaguement ovoïdes.

Les globules jeunes présentent en général une, rarement deux vacuoles et quelquefois pas.

Dimensions moyennes :

Grand diamètre	entre 0 ^{mm} ,008 et 0 ^{mm} ,011.
Petit —	— 0 ^{mm} ,004 et 0 ^{mm} ,006.

Le produit des moyennes de ces chiffres pouvant ainsi donner une idée de la dimension générale, donne le nombre 47,5. C'est là une donnée d'aspect superficiel tout à fait relative, mais qui peut servir de terme de comparaison numérique entre les 5 levures, et c'est pourquoi je le noterai dans les examens suivants sous le nom de surface moyenne de la coupe optique.

Dans du moût de raisin, la forme des globules de levure ne varie pas beaucoup, ils sont un peu moins allongés mais gardent leur aspect en poire, ce qui est tout à fait caractéristique à cette race.

Ils sont plus gros que dans le bouillon touraillon, comme l'indique du reste les dimensions suivantes :

Grand diamètre	entre 0 ^{mm} ,011 et 0 ^{mm} ,013.
Petit —	— 0 ^{mm} ,006 et 0 ^{mm} ,008.

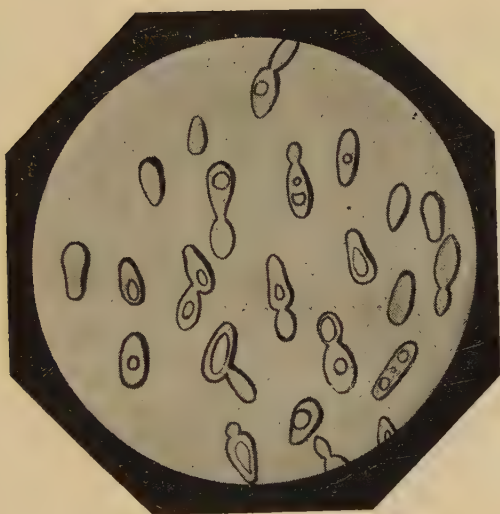
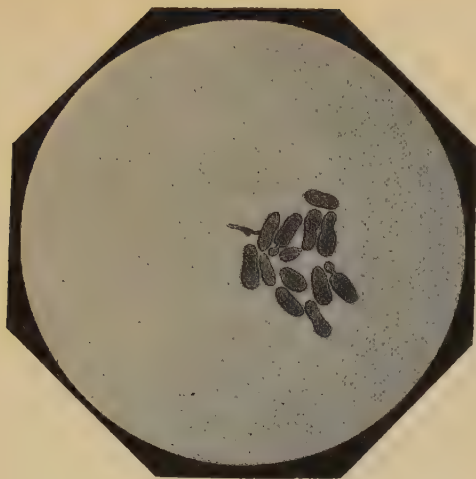
Surface moyenne de la coupe optique : 84.

Cette levure est très délicate, aussi dans les moûts acides et dans les cultures âgées elle devient très rapidement granuleuse.

FIG. SUPÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(photo-micrographie d'une préparation colorée).

FIG. MÉDIANE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(dessin d'une préparation directe).

FIG. INFÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le moût de raisin*
(dessin d'une préparation directe).



LEVURE I.

Levure II. — Le dépôt d'où elle fut isolée venait d'un moût provenant de Bouzy. Examinées dans le bouillon de touraillon, les cellules le plus souvent isolées les unes des autres sont quelquefois réunies deux à deux par les extrémités.

Dans les cultures jeunes, la forme principale est celle d'un cylindroïde allongé légèrement elliptique.

Quelques rares cellules exagèrent cette forme dans le sens de la longueur et deviennent très étroites, en forme de boudin ; d'autres encore plus rares se rapprochent de la forme elliptique régulière. La tendance de cette levure à la forme allongée s'accroît encore dans les cultures âgées.

On rencontre presque toujours plusieurs vacuoles dans les globules.

Dimensions moyennes :

Grand diamètre	entre 0 ^{mm} ,011 et 0 ^{mm} ,017.
Petit —	— 0 ^{mm} ,003 et 0 ^{mm} ,005.

Surface moyenne de la coupe optique : 56.

Bien que cette levure garde dans le moût de raisin son caractère distinctif de la tendance à la forme allongée, l'exagération dans le sens de la longueur est moins fréquente que dans le milieu précédent, et on constate dans celui-ci beaucoup plus de cellules ayant la forme elliptique régulière.

Comme la levure I, les globules y sont plus gros que dans le touraillon.

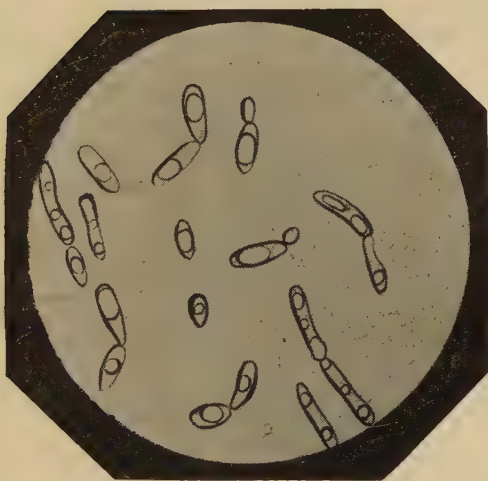
Grand diamètre	entre 0 ^{mm} ,011 et 0 ^{mm} ,014.
Petit —	— 0 ^{mm} ,004 et 0 ^{mm} ,005.

Surface moyenne de la coupe optique : 58,5.

FIG. SUPÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(photo-micrographie d'une préparation colorée).

FIG. MÉDIANE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(dessin d'une préparation directe).

FIG. INFÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le moût de raisin*
(dessin d'une préparation directe).



Levure III. — Le dépôt d'où elle fut isolée provenait de la fermentation de raisins de Verzenay. En milieu de touraillon, les cellules sont réunies et accolées les unes aux autres et forment les réseaux typiques décrits par Hansen. Elles semblent si intimement serrées que l'ensemble de l'agglomérat revêt l'aspect d'un dallage composé d'éléments polygonaux.

Dans les cellules jeunes, les cellules présentent une grande régularité de dimension et de forme qui est celle de l'ellipse normale.

Dans les cultures âgées, les globules se raccourcissent en s'arrondissant. Dans les cultures de quarante-huit heures, les cellules sont presque toutes dépourvues de vacuole.

Dimensions moyennes :

Grand diamètre	entre 0 ^{mm} ,005 et 0 ^{mm} ,008.
Petit —	— 0 ^{mm} ,004 et 0 ^{mm} ,005.

Surface moyenne de la coupe optique : 29.

Comme la précédente, l'aspect de cette levure examinée dans du moût de raisin, est tout à fait différent de celui décrit ci-dessus. Les globules également plus gros affectent une forme ronde à peu près régulière, qui devient presque générale quand cette espèce est âgée ou mise en souffrance.

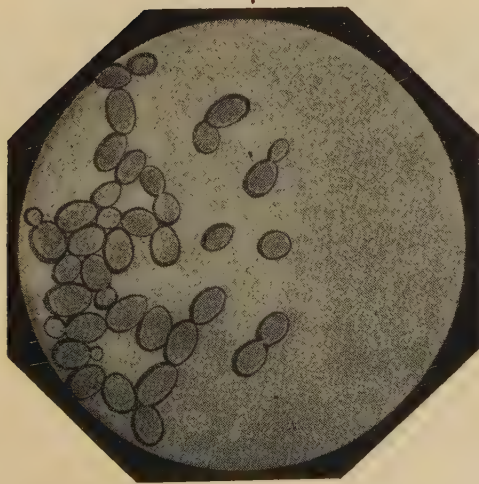
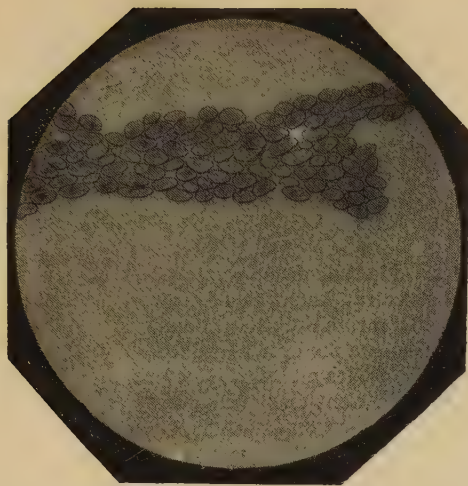
Grand diamètre	entre 0 ^{mm} ,006 et 0 ^{mm} ,008.
Petit —	— 0 ^{mm} ,005 et 0 ^{mm} ,006.

Surface moyenne de la coupe optique : 38.

FIG. SUPÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(photo-micrographie d'une préparation colorée).

FIG. MÉDIANE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(dessin d'une préparation directe).

FIG. INFÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le moût de raisin*
(dessin d'une préparation directe).



LEVURE III.

Levure IV. — Le dépôt d'où elle fut extraite provenait d'un moût du Mesnil-sur-Oger. Les cellules sont toutes isolées.

En culture jeune, la forme dominante très constante en aspect et dimensions est celle d'une ellipse presque régulière.

Dans les cultures âgées, les globules affectent une forme ronde. On ne voit qu'une vacuole, généralement très grosse.

Dimensions moyennes :

Grand diamètre	entre 0 ^{mm} ,006 et 0 ^{mm} ,013.
Petit —	— 0 ^{mm} ,004 et 0 ^{mm} ,006.

Surface de la coupe optique : 47, 5.

Contrairement aux autres, son volume dans le moût de raisin ne varie pas, mais elle suit la règle générale d'être moins allongée que dans le touraillon. On reconnaît aussi sa faculté de grande résistance, que nous retrouverons plus tard, en ce qu'elle garde même dans des dépôts anciens les caractères anatomiques qu'elle revêt à l'état jeune.

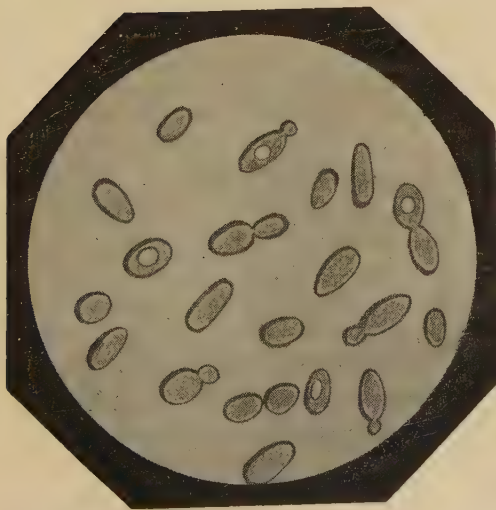
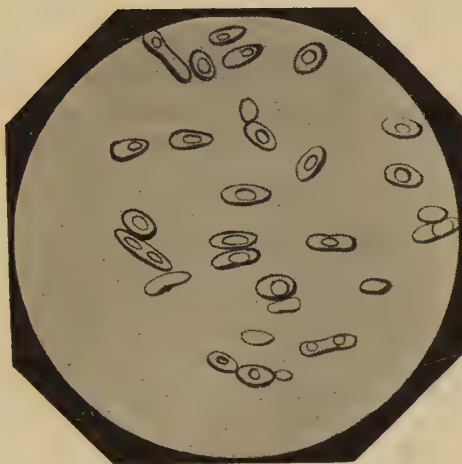
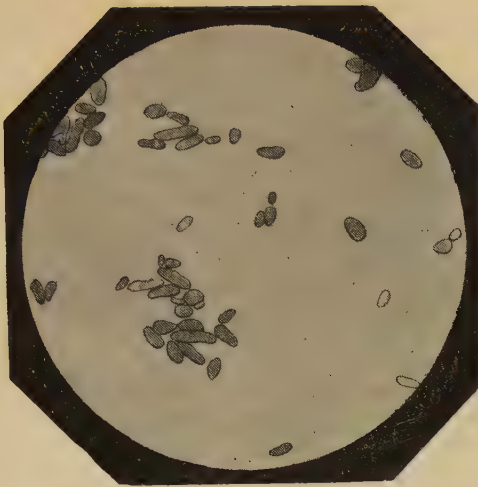
Grand diamètre	entre 0 ^{mm} ,008 et 0 ^{mm} ,012.
Petit —	— 0 ^{mm} ,005 et 0 ^{mm} ,006.

Surface moyenne de la coupe optique : 55.

FIG. SUPÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(photo-micrographie d'une préparation colorée).

FIG. MÉDIANE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon.*
(dessin d'une préparation directe).

FIG. INFÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le moût de raisin*
(dessin d'une préparation directe).



LEVURE IV.

Levure V. — Cette levure provient d'une cuvée de divers moûts des meilleurs vignobles champenois. Parmi toutes les diverses races isolées de cette lie, j'ai pris la levure V qui présente exactement les caractères de la levure décrite par Cordier sous le nom de levure principale de Champagne. Elle mérite évidemment ce nom, car, parmi les diverses variétés, c'est elle qui dominait dans ce dépôt formé par la fermentation de raisins provenant tous exclusivement de vignes champenoises, mais de régions très différentes renommées comme grands crus.

Quand on examine cette levure au milieu de touraillon, on voit les cellules réunies en agglomérats intimement serrées.

Les globules détachés du bloc ont une régularité constante dans leurs dimensions et leur aspect régulièrement ovoïde.

Dans les cultures âgées, les seules variantes sont représentées par certaines cellules devenant presque rondes et quelques-unes plus petites affectant une forme elliptique un peu plus effilée à une extrémité.

Jamais on ne voit de globules ayant une tendance à l'allongement de la cellule. Dans chacune d'elles on remarque une grosse vacuole.

Dimensions moyennes :

Grand diamètre entre 0^{mm},006 et 0^{mm},011.
Petit — — 0^{mm},005 et 0^{mm},006.

Surface moyenne de la coupe optique : 38.

La forme ovoïde donnée dans la description suivante devient ovale, presque ronde dans le moût de raisin. En outre les globules sont plus gros et montrent beaucoup moins de tendance à s'agglutiner les uns aux autres.

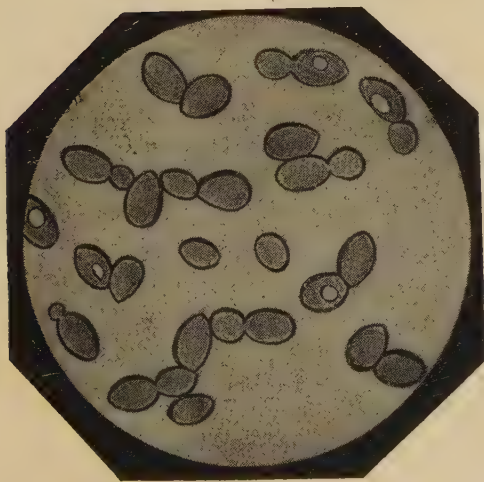
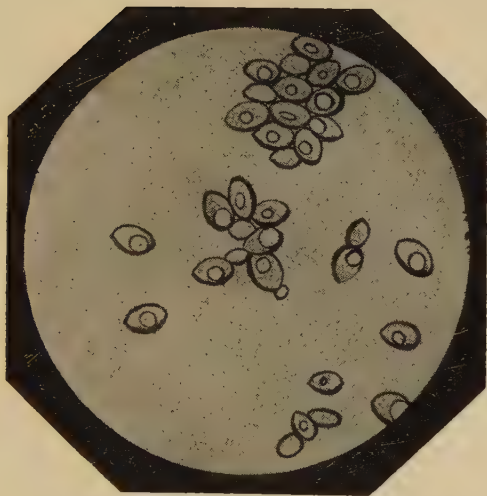
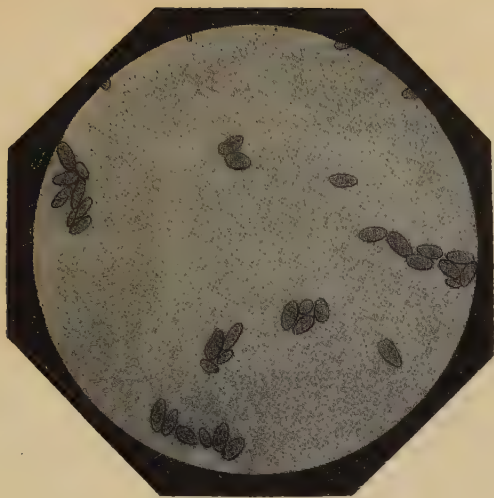
Grand diamètre entre 0^{mm},005 et 0^{mm},011.
Petit — — 0^{mm},005 et 0^{mm},008.

Surface moyenne de la coupe optique : 55.

FIG. SUPÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(photo-micrographie d'une préparation colorée).

FIG. MÉDIANE. — *Aspect de la levure dans le bouillon de touraillon*
(dessin d'une préparation directe).

FIG. INFÉRIEURE. — *Aspect de la levure dans le moût de raisin*
(dessin d'une préparation directe).



LEVURE V.

ASPECT MACROSCOPIQUE

Levure I. — Cette levure se dépose dans les moûts fermentés (bouillon de touraillon, moût de raisin), en un dépôt d'un grain assez fin, très adhérent au verre. Il faut une agitation persistante pour l'en séparer, le liquide surnageant ne se clarifie alors que lentement. Elle ne forme pas de voile.

Ensemencée dans du moût de raisin champenois, stérilisé à la bougie, le vin obtenu développe fortement le bouquet spécial du champagne et possède à la fois du corps et du moelleux.

A la température de 12, 15°, ce qui correspond à celle des celliers, la fermentation qu'elle provoque ne devient active que le quatrième ou le cinquième jour après l'ensemencement.

Levure II. — Le dépôt de cette levure dans les moûts est formé de grains assez fins, adhérents au vase. Il ne s'en détache qu'après une assez violente agitation, et le liquide ainsi troublé ne se clarifie que lentement.

Elle ne forme pas de voile.

Le vin obtenu par la fermentation de cette levure dans du moût de raisin de Champagne filtré à la bougie, possède le bouquet caractéristique des vins de ce pays, mais ne semble pas se distinguer par d'autres qualités personnelles.

Par contre, cette levure à la température de 10, 12° est en pleine fermentation deux jours après l'ensemencement.

Levure III. — Cette levure est une des rares espèces qui forment dans les moûts des dépôts caillebotés, appelés pour cette raison levures en grumeaux. Ces paquets grumeleux sont très mobiles, non adhérents aux vases, très difficilement dissociables, même par forte agitation. De là vient la difficulté de purifier ces levures et ensuite de les ensemer faiblement, le fil de platine n'enlevant, dans les liquides, que très rarement un globule.

Par contre, les liquides où elle a fermenté peuvent être agités aussi violemment que possible, ils redeviennent clairs immédiatement.

Elle ne forme jamais de voile.

Le vin obtenu par sa fermentation dans les conditions énoncées pour les deux précédentes levures, se rapproche de celui obtenu par la dernière de celle-ci. Mais il en diffère essentiellement comme des deux suivants, d'abord par un goût moins acide et par une coloration beaucoup plus forte.

La production d'une teinte plus foncée doit probablement tenir à

l'aptitude particulière de cette levure à se mettre en grumeaux. Cette propriété est tellement accentuée dans le moût de raisin, que le dépôt constitue une véritable pellicule. Comme autre signe très caractéristique de cette race, c'est la lenteur du départ de sa fermentation qui ne devient vraiment active à 12°, 13°, qu'au bout de six, sept jours après l'ensemencement.

Levure IV. — Cette levure se présente dans les moûts en dépôt poussiéreux non adhérent au vase. Ce dépôt est tellement fin que, après agitation, le liquide est très long à se clarifier. De la facile adaptation de cette levure à se diluer dans les liquides, provient la difficulté d'en obtenir des colonies séparées sur milieu solide. Les ensemencements doivent être faits avec de très fortes dilutions.

Sans donner de voile, elle donne irrégulièrement sur moût de raisin une petite pellicule très fine formée d'îlots plus ou moins confluents et qui ne persistent pas.

Il est probable aussi que, pour cette levure, c'est la façon de ténuité extrême avec laquelle elle se dépose dans le moût de raisin, qui détermine la plus faible teinte du vin obtenu, qui, comparé aux autres est beaucoup plus pâle. Elle lui donne en outre une autre qualité précieuse d'avoir une finesse de bouquet remarquable. Par contre, le vin est assez plat et relativement plus acide. La fermentation qu'elle provoque vers 12, 13°, en pleine activité trois jours après l'ensemencement, se termine très tôt comparativement aux quatre autres.

Levure V. — Comme la levure III, c'est aussi une levure en grumeaux ; elle en diffère cependant par l'aspect même des grumeaux.

Non adhérents au verre dans les moûts de touraillon et de raisin, ils se désagrègent assez facilement par l'agitation en petits paquets. Leur volume est beaucoup plus faible que ceux de la levure III ; aussi le liquide agité, quoique d'une clarification rapide, s'éclaircit un peu moins vite que ceux dans lesquels cette dernière est en suspension.

Elle ne forme pas de voile.

Des cinq levures étudiées, c'est celle qui, ensemencée dans le moût de raisin stérile comme du reste dans presque tous les milieux de culture et à n'importe quelle température, donne une fermentation qui se déclare et se termine toujours bien avant celles des autres.

Dans les conditions expérimentales précédentes, elle a fourni un vin à la fois bouqueté et corsé, mais n'ayant pas cependant la finesse du quatrième, la douceur du troisième et le cachet du premier.

ASPECT DES COLONIES SUR MILIEUX SOLIDES

Dans cet examen, après contrôle au microscope, de la pureté des cultures, j'ai cherché à obtenir sur moûts gélatinés et sur moûts gélosés, contenus dans des tubes à essai et des fioles d'Erlenmayer, la formation du nombre minimum des colonies.

Ce mode d'ensemencement m'a permis d'obtenir des colonies géantes sur gélose, dont les caractères différentiels sont beaucoup plus marqués que chez les jeunes colonies toujours de peu d'étendue. Tandis qu'avec la levure III il y avait toujours une certaine difficulté à l'obtention des colonies en raison de la faible dissociation de ses grumeaux, les levures II et IV présentaient le défaut d'excès contraire; en raison de leur facile dissémination dans les divers liquides, elles ont donné très souvent des milieux beaucoup trop chargés.

Il ne faudrait pas évidemment trouver dans ces essais une base essentielle de différenciation. Je tiens cependant à faire remarquer la constance de telle levure à s'organiser toujours de façon à présenter une colonie d'ensemble, dans laquelle on retrouve, pour chacune, un ou deux caractères particuliers et constants.

Levure I. — *Colonies sur moût gélatiné* : Les jeunes colonies sont rondes, blanches, ayant l'aspect d'un grain de millet.

En vieillissant, elles s'étalent beaucoup, prennent la forme de cercles plus ou moins réguliers avec une légère proéminence au centre, leur contour est net.

Colonies sur moût gélosé : Jeunes elles sont rondes, blanches, légèrement bombées avec proéminence centrale de couleur rosée.

En vieillissant elles deviennent brunes, leur surface se couvre de sillons et de saillies, ce qui leur donne un aspect réticulé spécial. Toute la colonie est entourée d'une auréole plus claire dont le bord est frangé.

Caractères constants et particuliers : Proéminence centrale, périphérie circulaire et nette des colonies sur moût gélatiné.

Aspect réticulé et auréolé des vieilles colonies sur moût gélosé.

Levure II. — *Sur moût gélatiné* : Les colonies représentées au début par de très petits points blancs, prennent très vite en grossissant un caractère général d'irrégularité dans leur forme et leurs dimensions. Quelques-unes sont rondes, d'autres ovales, un certain nombre se dressent en éperons. Les colonies âgées ne tendent pas à s'étaler, elles gardent leur cachet primitif d'irrégularité et toutes s'entourent d'une bordure continue plate et translucide.

Sur moût gélosé : Jeunes, les colonies sont plus ou moins rondes et d'un blanc grisâtre miroitant. En vieillissant, elles s'étendent d'une façon assez régulière, gardent le même aspect, la même coloration et se frangent légèrement à la périphérie.

Une partie centrale proéminente persiste avec l'âge.

Caractères particuliers et constants : Diversité de formes des colonies sur gélatine (colonies en éperon).

Persistance de la coloration et de l'aspect primitifs chez les vieilles colonies sur gélose.

Levure III. — *Sur moût gélatiné* : Les jeunes colonies ont l'aspect d'un grain de millet, en grossissant, elles restent rondes, régulières, plus ou moins bombées, puis, très rapidement par suite d'évagination périphérique le pourtour devient sinueux et frangé.

Sur moût gélosé : Même à l'état jeune, les colonies ne sont pas régulièrement rondes, aussi avec l'âge l'irrégularité s'accroît. D'une émergence lisse centrale, on voit partir des saillies se dirigeant dans le sens des rayons donnant à l'ensemble l'aspect d'une étoile à branches multiples inégales.

Caractères constants et particuliers : Forme ronde, régulière, à bord sinueux des colonies sur moût gélatiné.

Aspect étoilé caractéristique de celles sur moût gélosé.

Levure IV. — *Sur moût gélatiné* : Les colonies constituées par de petits points blancs tout au début, se transforment très rapidement en taches plates, très blanches, qui se couvrent de petites saillies circulaires parallèles. Avec l'âge, elles restent néanmoins toujours très petites et plates. Puis elles émettent sur leur bord une multitude de pointes courtes et fines qui donnent à l'ensemble de la colonie l'aspect de petites roues dentées.

Sur moût gélosé : Les colonies très jeunes ressemblent à de petites taches de bougies, mais bientôt, elles deviennent très caractéristiques par leur aspect régulier et original. D'un petit cercle central en relief, partent des saillies sinueuses plus ou moins rayonnantes et qui sont coupées par d'autres, circulaires et parallèles. Il en ressort un effet de broderie assez joli et tout à fait spécial.

Caractères particuliers et constants : Aspect des colonies sur gélatine en forme de roues dentées. Formes ouvragées selon un certain dessin des colonies gélosées.

Levure V. — *Sur moût gélatiné* : Les jeunes colonies sont rondes, régulières, elles y restent presque toujours et émettent, après un certain temps, une multitude de petites pointes courtes et fines qui disparaissent ensuite en laissant à la vieille colonie une forme peu régulière, à contour plus ou moins sinueux et crénelé.

Sur moult gélosé : Les colonies ont des formes peu régulières, tantôt rondes, tantôt ovales avec contour net, d'un aspect uniformément blanc d'ivoire. Une légère proéminence est à peine visible dans la partie centrale.

Les colonies âgées ne portent jamais de saillies, sont irrégulières, plates, à peine frangées à la périphérie et sont parsemées à la longue de petites granulations caractéristiques.

Caractères particuliers et constants : Présence des petites pointes fines qu'hérissent les colonies sur gélatine.

Persistance des colonies sur gélose à garder longtemps une surface unie, qui n'est troublée qu'à la longue par de petites granulations.

III. — Propriétés physiologiques.

Étant parti des cultures de levure issues d'une seule cellule, jusqu'ici, il n'y a que les propriétés morphologiques qui aient été employées comme premiers moyens de différenciation, ainsi que les différences observées dans l'aspect du développement des levures sur milieux solides. Mais il faut dire avec M. FERNBACH ¹, que ces caractères n'ont rien de bien précis. De plus, circonstance particulièrement importante, ils peuvent varier avec les conditions de milieu, de température et, pour une même culture, avec l'âge de la culture.

C'est donc aux propriétés physiologiques des levures qu'il faut s'adresser, et, comme les points de vue auxquels on peut se placer sont très divers, le champ d'investigation devient aussitôt excessivement vaste.

1° RÉSISTANCE A LA CHALEUR

Une première méthode de différenciation mise en pratique par M. KAYSER ², est celle de la résistance à la chaleur.

Cet auteur admet que la plupart des levures périssent à l'état humide, entre 55 et 60° après cinq minutes de chauffage. Il ajoute que les différentes observations sur la température mortelle des levures ne s'accordent pas toujours entre elles, même lorsque les expériences paraissent avoir été faites dans les mêmes conditions. Une partie des différences observées, vient sûrement de ce qu'il y a place pour des variations notables dans l'action de la chaleur et que, d'autre part, l'évaluation des températures réelles des globules de levures est diffi-

1. FERNBACH : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1898, t. 1, p. 51.

2. KAYSER : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1889, t. 3, p. 513.

cile. De plus, les observations à ce sujet qui signalent des températures mortelles supérieures à 60° étant relativement anciennes, il est permis de douter de l'état de pureté des espèces de levures essayées. Par contre, celles données par M. Kayser dans ce même travail pour deux levures de vin concordent pleinement avec les résultats suivants fournis par les cinq levures de Champagne; l'une, le *Saccharomyces Pastbrianus*, meurt à 50 et 53°; l'autre, une levure de Saint-Emilion, est détruite à 55°.

Comme *modus operandi*, les cultures de la levure à étudier, contenues dans des tubes capillaires scellés, ont été chauffées aux diverses températures pendant cinq et dix minutes.

Les levures ainsi traitées ont ensuite été ensemencées chacune dans un milieu et à une température favorables.

Température de 45°. — *Première expérience* (durée, 5 minutes) : aucune levure ne meurt.

Deuxième expérience (durée, 10 minutes) : aucune levure ne meurt. Les levures I et III ont souffert de la chaleur, car elles donnent un départ de fermentation très languissant.

Température de 50° — *Première expérience* (durée, 5 minutes) : les levures I et III meurent.

Deuxième expérience (durée, 10 minutes) : les levures II, IV et V résistent.

Température de 55°. — *Première expérience* (durée, 5 minutes) : les levures II, IV et V meurent.

Deuxième expérience (durée, 10 minutes) : la levure IV résiste.

Température de 60°. — *Première expérience* (durée, 5 minutes) : la levure IV résiste.

Deuxième expérience (durée, 10 minutes) : la levure IV meurt.

A côté de ces résultats qui sont très nets et par conséquent très précieux au point de vue scientifique, ces données ne pourraient servir dans la pratique que pour la stérilisation des moûts. Aussi, pour compléter cette action de la chaleur, il m'a semblé intéressant de déterminer pour chacune de ces levures la température la plus favorable. Il faut entendre par là, la détermination du degré qu'affectionne chacune d'elles, pour que la fermentation parte le plus vite tout en donnant en même temps le produit le plus parfait, cherchant ainsi à réaliser les conditions idéales de la pratique vinicole. Les expériences ont été faites en employant le moût de raisin et les températures d'expérimentation furent choisies aux environs de 15° et de 27°. Les

levures furent ensemencées de la même façon, dans le même moût, contenu dans des vases identiques.

Température de 15° environ. — Trois jours après l'ensemencement, les levures IV et V, et surtout la levure II, fermentent activement. La levure I commence, la levure III ne donne aucun signe de fermentation.

Cinq jours après l'ensemencement, la levure III commence à faire fermenter le moût; les quatre autres sont en pleine activité.

Treize jours après ensemencement, les levures IV et V finissent leur fermentation.

Après quinze et seize jours, les moûts des levures I et II, puis celui de la levure III en dernier lieu, sont complètement fermentés.

Température de 27° environ. — Deux jours après l'ensemencement, tandis que les moûts des levures IV et II fermentent bien, que celui de la levure V est en pleine fermentation, ceux des levures III et I commencent à peine.

Trois et quatre jours après l'ensemencement, toutes les levures fermentent activement.

Après cinq et six jours, les levures II et IV ralentissent beaucoup.

Après huit jours, le moût des levures I, III, V ont cessé de fermenter, les deux autres ont une fermentation languissante.

Après douze jours, la fermentation provoquée par ces levures II et IV est également terminée.

2° RÉSISTANCE A L'ACIDITÉ ET A L'ALCALINITÉ

Un second mode de distinction des levures essayé aussi par M. KAYSER¹, consiste à ensemencer les diverses races à distinguer ou à identifier, dans un même milieu sucré auquel on ajoute des quantités croissantes d'alcali ou d'acide.

Dans cet essai, il importe d'opérer d'une façon très minutieuse et très méthodique, sans quoi on risquerait fort de fournir des résultats erronés. Les conditions expérimentales suivies ont été les suivantes :

Les différentes doses d'acide tartrique exactement dosées, furent ajoutées à des volumes égaux de moût constitué par du bouillon de touraillon saccharosé, glucosé et rigoureusement neutre. Dans cette expérience, il importe aussi d'éloigner toute cause d'erreur déterminée par une circonstance secondaire quelconque, qui pourrait aider la levure à réagir contre l'acidité du milieu. Ce serait le cas, par exemple,

1. KAYSER : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1896, t. 10, p. 51.

d'un large ensemencement à la pipette. Aussi, on doit ensemercer une quantité minime et toujours égale de ferment en employant le fil de platine. Je ne saurais mieux faire ressortir l'importance de cette remarque qu'en signalant avoir obtenu par ensemencement à la pipette des fermentations dans des milieux titrant 4-5-5,5-6 % d'acide tartrique.

Par contre, voici les résultats obtenus par la méthode ci-dessus indiquée et, seule véritablement exacte :

Bouillon contenant 1 % d'acide tartrique : Les levures I, II, IV, V, fermentent; la levure III fermente, mais donne un départ tardif.

Bouillon contenant 2 % d'acide tartrique : Les cinq levures fermentent. Tandis que les levures I et III tardent à partir, la levure IV donne un départ rapide.

Bouillon contenant 2,5 % d'acide tartrique : La levure IV fermente seule.

Bouillon contenant 3 % d'acide tartrique : La levure IV fermente encore.

Bouillon contenant 3,5 % d'acide tartrique : Plus une levure ne fermente.

La résistance des levures à l'alcalinité du milieu vient compléter les données fournies par l'étude de leur attitude particulière envers la réaction acide; les deux caractères permettent ainsi de les différencier, tout en fournissant des renseignements précieux sur leur nature intime.

Toutes ont une sensibilité beaucoup plus marquée pour l'alcalinité que pour l'acidité.

Afin de pouvoir évaluer exactement les doses de potasse essayées, le bouillon de touraillon était neutralisé avant d'être additionné d'une solution de potasse ajoutée dans les proportions de 0 gr. 25 de KOH ‰ dans la 1^{re} série; 0 gr. 50, dans la 2^e série; 1 gr. dans la 3^e série et 1 gr. 50, dans la 4^e série.

Ces chiffres ont été déterminés dans des témoins après stérilisation et avec une liqueur acide titrée.

1^{re} série. — *Milieu renfermant 0 gr. 25 ‰ de KOH* : Les cinq levures fermentent uniformément.

2^e série. — *Milieu renfermant 0 gr. 50 ‰ de KOH* : La levure IV est en pleine fermentation après six jours, la levure V après sept jours, la levure III après onze jours, la levure I après quatorze jours; la levure II ne donne aucune fermentation.

3^e série. — *Milieu renfermant 1 gr. $\frac{1}{100}$ de KOH* : La levure IV fermente après sept jours.

4^e série. — *Milieu renfermant 1 gr. $\frac{50}{100}$ de KOH* : Aucune levure ne fermente.

3^e RÉSISTANCE A L'ALCOOL

On sait que les levures mises en présence d'un liquide contenant une certaine dose d'alcool ne décomposent plus les sucres fermentescibles.

C'est cette propriété qui est mise à profit pour l'obtention des vins liquoreux d'un titre alcoolique élevé et qui contiennent, après fermentation, un résidu de sucre important, qui leur donne leur saveur spéciale. On peut donc se servir de l'action paralysante de fortes quantités d'alcool sur les levures pour les distinguer.

Non seulement ce moyen est précieux pour différencier toutes les levures en général, mais il l'est encore plus pour celles de champagne. On verra, en effet, dans un chapitre suivant dans lequel est résumée la manutention des vins de Champagne, que l'un des stades les plus importants de ce travail dénommé « prise de mousse », consiste à faire fermenter la levure dans un vin titrant 10 à 12 $\frac{1}{100}$ d'alcool et 20 à 26 gr. $\frac{1}{100}$ de sucre. C'est cette seconde fermentation qui fournit jusqu'à six atmosphères d'anhydride carbonique, lequel retombe vers trois atmosphères après le dégorgement. Ce gaz retenu énergiquement par un phénomène d'attraction spéciale du vin, dénommé pouvoir absorbant, donne, selon le terme consacré, le mousseux au vin de Champagne.

Les ensemencements ont toujours été pratiqués avec des doses égales de ferment et avec la plus petite quantité possible.

Le moût avant fermentation titrait 57 gr. $\frac{1}{100}$ de sucre réducteur, 9^e comme degré alcoolique.

Pour tenir compte de la perte en alcool produite pendant le temps de la fermentation à la température de 25 et 27°, perte calculée sur un témoin, voici les résultats obtenus après correction de l'évaporation de l'alcool.

					TITRE ALCOLIQUE
Levure	I.	4 gr. 5 de sucre disparu sur 5 gr. 7 $\frac{1}{100}$.	.	.	9 ^e 5 + 2 ^e 0 = 11 ^e 5
—	II.	0 gr.	—	—	9,5 + 0,0 = 9,5
—	III.	5 gr.	—	—	9,5 + 2,2 = 11,7
—	IV.	Il n'en reste que des traces, donc 5 gr. 7.	.	.	9,5 + 3,0 = 12,5
—	V.	—	—	—	9,5 + 3,0 = 12,5

Les départs de sucre sont en concordance avec les chiffres des quantités d'alcool produit.

L'aspect des dépôts de levure n'est pas modifié. Ainsi les levures III et V gardent leur dépôt grumeleux et mobile. Cette considération a une très grosse importance au point de vue pratique sur laquelle je reviendrai plus loin.

4° RÉSISTANCE AUX ANTISEPTIQUES

L'étude de la résistance des levures aux divers antiseptiques, qui constitue un moyen nettement scientifique de différenciation, est encore aussi intéressante à d'autres points de vue.

D'abord, c'est que, pour des raisons multiples et diverses, certains vigneron additionnent leurs moûts de produits chimiques divers.

Puis, en raison de l'emploi de plus en plus fréquent en viticulture de nombreux composés antiparasitiques, telles par exemple, les préparations cupriques, dont l'usage est de plus en plus répandu. L'oxyde de cuivre qu'elles contiennent peut évidemment passer dans les moûts et se dissoudre ensuite dans les vins.

Un antiseptique en œnologie étant par définition une substance dont l'intervention sous une forme quelconque dans une fermentation modifie la marche du phénomène, il était donc nécessaire de fixer un choix. Aussi, ai-je limité mes recherches à l'action envisagée d'une façon très générale de trois de ces composés en rapport avec les nouveaux procédés de culture de la vigne et avec la cuisine vinaire moderne. Ce sont le sulfate de cuivre, l'eau oxygénée, le sulfite acide de soude cristallisé, appelé encore métabisulfite de soude.

Il n'est pas superflu de rappeler quelques notes bibliographiques au sujet de ces trois corps, comme on le verra plus loin en considérant ses résultats de mes expériences,

L'action du sulfate de cuivre sur les levures a été étudiée par ROMMIER¹, qui a cherché le premier quelle pouvait être son influence, puis plus tard par BIERNACKI² et KRÜGER³. Leurs divers résultats ne concordent pas sur les doses toxiques, mais ils tombent cependant d'accord pour affirmer que la fermentation devient d'autant plus incomplète qu'on augmente davantage les doses de cuivre.

P. BERT et REGNARD⁴ ont trouvé que l'eau oxygénée tue subitement la levure de bière et la fermentation ne reprend pas, même après élimination de l'eau oxygénée par l'une des substances qui la détruisent le plus rapidement.

1. ROMMIER : *C. R. Ac. Sc.*, 1891, t. 110, p. 536.

2. BIERNACKI : *Pfluger's Archiv*, 1891, t. 49, p. 112.

3. KRÜGER : *Centralb. f. Bakt.*, 1895 [2], t. 1 p. 10.

4. P. BERT et REGNARD : *C. R. Ac. Sc.*, 1888^a, 94, p. 1383.

L'influence de l'acide sulfureux fut examinée d'abord par DUMAS¹ dans son étude des divers composés chimiques sur la fermentation. Elle ne fut reprise depuis que par divers œnologues qui l'envisagèrent surtout au point de vue mutage des vins.

On admet que l'acide sulfureux à la dose de 0 gr. 03 par litre retarde la fermentation de dix à douze heures ; avec 0 gr. 03, le retard est porté de dix-huit à vingt-quatre heures ; avec 0 gr. 075, de quarante-huit à soixante heures.

ACTION DE L'EAU OXYGÉNÉE.

Avant d'envisager les doses de cet antiseptique qui arrêtent une fermentation provoquée par une levure donnée, je crois curieux à signaler le fait suivant : un moût de raisin abandonné à l'air, à la température de 25° et contenant 2 cm³ par litre d'eau oxygénée à 10 volumes, a retardé de cinq jours le départ de sa fermentation naturelle. Ce retard a été déterminé par comparaison avec le même milieu placé dans des conditions semblables, mais non oxygéné.

D'autre part, ce moût, additionné de 2 ‰ d'eau oxygénée, mais alors ensemencé par quantités égales avec les cinq levures de Champagne, gagna trois jours d'avance sur le départ de la fermentation du même moût non oxygéné.

Pour étudier la résistance des levures, l'eau oxygénée a été ajoutée dans les moûts, au moment où chacune d'elle était en pleine fermentation.

Les constatations faites ont été les suivantes :

La *levure I* est arrêtée complètement avec 30 cm³ d'eau oxygénée par litre.

La *levure II* est celle des cinq levures qui offrent la plus de résistance à cet antiseptique. Elle peut, en effet, supporter, sans que son pouvoir ferment se ralentisse, trois doses successives de 20 cm³. Une quatrième dose, ce qui représente une somme totale de 80 cm³ ‰ la détruit.

La *levure III* est provisoirement arrêtée par 40 cm³, mais il faut aller jusqu'à 65 ‰ pour qu'elle cesse de provoquer la fermentation.

La *levure IV* est, comme la première, entravée par 30 cm³, mais il faut 40 cm³ ‰ pour arrêter complètement son action.

La *levure V*, momentanément immobilisée par 40 cm³, le devient d'une façon définitive en présence de 75 cm³ ‰.

L'ordre de classement, d'après le maximum de résistance de ces levures, vis-à-vis de l'eau oxygénée, est donc le suivant : levure II, levure V, levure III, levure IV, levure I.

1. DUMAS : C. R. Ac. Sc., 1872, t. 75, p. 277.

ACTION DU SULFITE ACIDE DE SOUDE.

La dose courante de métabisulfite de soude employé en œnologie, soit pour arrêter momentanément la fermentation, soit pour tuer les oxydases productrices de la coloration des vins, est de 10 gr. par hectolitre.

C'est sur cette donnée que je me suis basé pour me rendre compte des attitudes diverses que prendraient chacune des cinq levures vis-à-vis de cet antiseptique, en ajoutant 0 gr. 150 de ce sel par litre de moût de raisin.

Les résultats obtenus comparés avec ceux produits dans les mêmes conditions avec le moût naturel, montrent tout d'abord un effet nocif sur les cinq levures.

La levure I est la plus impressionnée; il y a diminution d'un degré sur l'alcool. Cette constatation met encore en évidence sa constitution délicate.

La levure IV est celle qui a ressenti le moins l'effet toxique de l'acide sulfureux, sa fermentation du reste fut active et rapide.

Les levures II, III, IV se comportent à peu près de la même façon en présence de cet antiseptique, si l'on en juge par exemple d'après les rendements en alcool.

	DEGRÉ ALCOOLIQUE			ACIDITÉ TOTALE (en acide tartrique par litre)		
	Moût naturel	Moût bisulfité	Dif-férences	Moût naturel	Moût bisulfité	Dif-férences
Levure I.	8°0	7°0	— 1°0	11,2	13,1	+ 1,9
— II.	6,9	6,5	— 0,4	11,6	13,5	+ 1,9
— III.	7,3	7,0	— 0,3	10,0	11,9	+ 1,9
— IV.	6,9	6,9	0,0	11,6	13,5	+ 1,9
— V.	7,3	6,8	— 0,5	11,8	13,1	+ 1,3

ACTION DU SULFATE DE CUIVRE.

Pour étudier l'influence du sulfate de cuivre, il faut considérer ce sel sous deux points de vue; d'abord comme excitant, puis comme retardateur.

KRÜGER¹ a donné le chiffre de 0 gr. 090 ‰ comme limite maxima de la dose excitante; à partir de cette dose et jusqu'à des quantités pouvant atteindre 0 gr. 180 ‰ l'effet est retardateur.

1. KRÜGER : *Centralb. f. Bakt.*, 1895 [2], t. 1, p. 10.

1^{re} expérience. — Les chiffres précédents ne sont pas en accord avec les expériences suivantes, dans lesquelles pour la 1^{re} expérience, le moût de raisin a reçu 0 gr. 150 par litre de sulfate de cuivre. Ce sel a été introduit à l'état dissous, après stérilisation du moût. Aucun précipité pouvant entraîner du cuivre n'a été observé dans les liquides.

La fermentation a duré dix jours. La levure III et la levure V ont fini les premières, les levures II et IV étaient en pleine activité deux jours après l'ensemencement. La levure I a montré une fermentation faible et languissante.

Sauf pour cette dernière, les degrés alcooliques des vins obtenus, permettent de constater un effet favorable très marqué dû au sulfate de cuivre. Son addition ayant été faite dans les proportions de 0 gr. 150 par litre, la limite de la dose excitante du sulfate de cuivre hydraté serait reculée de 0 gr. 100 ‰ sur les chiffres donnés par KRÜGER.

	DEGRÉ ALCOLIQUE			ACIDITÉ TOTALE (en acide tartrique par litre)		
	Moût naturel	Moût cuivré	Dif- férences	Moût naturel	Moût cuivré	Dif- férences
Levure I.	8°9	7°4	— 0°6	11°2	12°7	+ 1°5
— II.	6,9	7,5	+ 0,6	11,6	13,1	+ 1,5
— III.	7,3	8,0	+ 0,5	10,0	12,7	+ 2,7
— IV.	6,9	7,5	+ 0,6	11,4	13,1	+ 1,5
— V.	7,3	8,0	+ 0,5	11,8	12,4	+ 0,6

2^e expérience. — Le même moût de raisin a été additionné selon le même *modus operandi* de 0 gr. 025 de sulfate de cuivre par litre. A cette dose, le sel ne joue plus le rôle d'agent favorable à la fermentation. Tout au contraire, sauf pour la levure II et la levure IV qui, là encore, se différencient des autres par leur résistance, il est nettement nuisible. Les quantités d'alcool formé en sont une preuve :

		DEGRÉ ALCOLIQUE	
		dans moût cuivré	dans moût naturel
La levure I a donné.		7°2	8°0
— II —		7,0	6,9
— III —		6,5	7,3
— IV —		7,0	6,9
— V —		7,0	7,3

IV. — Sporulation.

Déjà par ces quatre moyens d'action : résistance à la chaleur, à l'alcool, aux antiseptiques, influence de la réaction du milieu, on peut déduire dès maintenant que, dans l'ensemble des faits, la levure I et la levure III sont fragiles et délicates; que la levure V est vigoureuse et active; que la levure II et la levure IV sont celles qui, en général, offrent le plus de résistance aux divers agents qui peuvent les mettre en souffrance. On pourrait dire d'elles, qu'elles ont un bon et robuste tempérament.

Parmi les caractères constants des levures, il en est un des plus importants qui fut préconisé par HANSEN¹. C'est, le temps que demande pour la formation des spores chaque espèce, quand on opère dans les mêmes conditions, aux mêmes températures, avec le même liquide nourricier et avec des cellules jeunes et vigoureuses.

J'ai employé deux moyens d'inanition. Le procédé classique des blocs de plâtre et un second moins connu, préconisé autrefois par M. KAYSER, et relaté par DUCLAUX², qui m'a donné d'excellents résultats. Les cultures jeunes de levures contenues dans des petits matras PASTEUR, aussitôt la fermentation terminée et le dépôt bien formé, sont débarrassées de tout le liquide fermenté surnageant.

Ce précipité ainsi séparé et isolé, est délayé dans de l'eau stérilisée et transporté en partie et aseptiquement dans d'autres matras PASTEUR, contenant de l'eau stérile renfermant 2 % environ de lactose et des traces de bouillon de LIEBIG.

Soit dans de dernier milieu, soit dans les matras où il n'y a que de l'eau en contact avec les globules, les spores se forment bien et même mieux que sur les blocs de plâtre. De plus, ces conditions expérimentales sont beaucoup plus à l'abri des infections possibles.

Deux températures différentes furent essayées pour la sporulation.

TABLEAU DES TEMPS QUE METTENT LES LEVURES A PRODUIRE LEURS SPORES, CALCULÉS A PARTIR DU MOMENT OU ELLES ONT ÉTÉ MISES EN SOUFFRANCE PAR LES MOYENS INDIQUÉS CI-DESSUS:

A la température de 15°, les premiers spores formées apparaissent :

Pour la levure	I	Après 144 heures.
—	III	— 192 —
—	IV	— 120 —
—	V	— 144 —

1. HANSEN : *Meddelser fra Carlsberg Laboratoriet*, 1900, t. 3, p. 9.

2. DUCLAUX : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1889, t. 3, p. 557.

A la température de 25° :

Pour la levure	I	Après 360 heures.
—	III	— 240 —
—	IV	— 120 —
—	V	— 48 —

Quant à la levure II, observée aux deux températures pendant ces trois derniers mois d'une façon quotidienne, à aucun moment je n'ai pu observer de spores. Cette levure étant la plus ancienne apportée au laboratoire, il est probable qu'elle a perdu la faculté de former des spores; ce fait a du reste été déjà signalé par de nombreux auteurs entre autre BOULLANGER¹ qui dit l'avoir constaté lui-même en ajoutant encore que HANSEN l'avait déjà remarqué auparavant.

V. — Étude de la nutrition hydrocarbonée.

Certaines levures peuvent produire exclusivement le dédoublement du glucose, d'autres celui du lactose, du maltose, certaines font fermenter l'un et l'autre, mais alors avec préférence pour tel sucre variable avec chacune. Ceux-ci sont donc les aliments habituels de la levure, mais dans l'étude de leur consommation et de leur transformation, il y a lieu de considérer à la fois la nature du polyose et celle de la levure.

En effet, la propriété de pouvoir faire fermenter un sucre déterminé est une faculté spéciale à chaque levure qui présente une certaine fixité, et peut même survivre aux variations de ses conditions d'existence.

De plus, la disparition par fermentation des sucres renfermant plus de six atomes de carbone dépend d'une sécrétion diastasique.

La différenciation des levures par des aliments hydrocarbonés correspond donc bien à une propriété physiologique profonde.

Notons encore à ce sujet les expériences de M. BOURQUELOT², qui a observé, à propos du lactose, des fermentations par entraînement dans lesquelles une fermentation amorcée avec un sucre fermentescible, pouvait gagner un sucre non fermentescible.

Le fait est général et les levures sont en situation de sécréter toutes les diastases hydrolysantes des divers saccharides, à l'exception de la lactase. C'est une question non de nature mais d'alimentation ou d'éducation. Néanmoins, la facilité de fermentation est variable pour une même levure avec divers sucres et par plusieurs levures avec le

1. BOULLANGER : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1896, t. 10, p. 599.

2. BOURQUELOT : *C. R. Ac. Sc.*, 1888, t. 106, p. 283.

même sucre, ce qui permet de les différencier et voir qu'elles ne s'équivalent pas.

Ce sont là évidemment des arguments de différenciation bien autrement puissants que tel ou tel caractère de morphologie. Toutefois, il ne faut pas poser ces qualités biologiques, pas plus du reste que celles qui seront décrites par la suite de ce travail comme absolues.

Existe-t-il, pour les êtres vivants et tout particulièrement pour les infiniments petits, des règles immuables, même dans leur physiologie tout intime?

Je suis bien loin de le croire et tout au contraire, au fur et à mesure que j'avais dans cette étude, je me suis rendu compte davantage de la fragilité organique de ces végétaux inférieurs. Je me suis de plus en plus convaincu des perturbations que peuvent amener dans leurs caractères morphologiques, biologiques et physiologiques, des éléments, quelquefois si minimes, qu'ils échappaient à toutes investigations.

Pour l'étude de l'influence des divers sucres, le bouillon de touraillon ordinaire donnerait des résultats erronés. Ce milieu renferme naturellement une proportion notable de sucres fermentescibles. Aussi, afin de pouvoir juger exactement la faculté d'assimilation des différents polyoses par les cinq levures, les expériences ont été faites avec le bouillon de touraillon préalablement fermenté. Ayant subi ensuite la stérilisation à 120°, les diastases formées au cours de cette fermentation préparatoire avaient été détruites.

ASSIMILATION DU GLUCOSE.

Sur 200 gr. ‰ la levure	I	en fait disparaître.	. . .	188 gr.
—	II	—	. . .	188
—	III	—	. . .	190
—	IV	—	. . .	191
—	V	—	. . .	194

Il n'y a pas de différences sensibles entre les divers résultats.

ASSIMILATION DU LÉVULOSE.

Sur 200 gr. ‰ la levure	I	en fait disparaître.	. . .	174 gr.
—	II	—	. . .	194
—	III	—	. . .	176
—	IV	—	. . .	195
—	V	—	. . .	194

Les levures II, IV, V ont fait disparaître la même et la plus grande quantité de sucre; si l'on en juge encore par l'allure extérieure de la fermentation, la levure IV semble s'assimiler avec avidité le lévulo-

lose. Cette faculté est intéressante, car, comme l'ont montré MM. KAYSER et MANCEAU¹, c'est surtout au dépens du lévulose restant dans les moûts et non utilisé par les levures que certains ferments des maladies, tel que celui de la graisse, peuvent favorablement se développer.

ASSIMILATION DU GALACTOSE.

Aucune levure ne le fait fermenter.

ASSIMILATION DU MALTOSE.

Les cinq levures de Champagne font fermenter alcooliquement ce sucre. Toutefois, d'après la lenteur du départ et l'allure languissante de la fermentation, ce disaccharide semble moins bien convenir à la levure I et à la levure III qu'aux trois autres levures.

Cette expérience montre que l'on ne doit pas qualifier de levures de vendange les levures décomposant le saccharose et non le maltose, comme l'indique certaines classifications².

ASSIMILATION DU LACTOSE.

Aucune levure ne le fait fermenter

ASSIMILATION DU RAFFINOSE.

Aucune levure ne le fait fermenter.

1. KAYSER et MANCEAU : *C. R. Ac. Sc.*, 1906, t. **143**, p. 247.

2. BEILLE : *Précis de botanique pharmaceutique*, Lyon, 1904, t. **1**,^{er} p. 305.

CHAPITRE II

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA NUTRITION AZOTÉE GÉNÉRALE DES LEVURES DE CHAMPAGNE

I. — Historique de la nutrition azotée de la levure.

Après l'étude de la nutrition hydrocarbonée, l'ordre rationnel des faits appelle celle de la nutrition azotée.

Il semble qu'on ne doive pas séparer ces deux questions quand il s'agit de vie végétale et cela encore moins en matière de levures.

Si, dans cette étude, celle-ci forme un chapitre particulier, c'est que, outre un apport nouveau de faits qui rentre au plus haut point dans un premier but de différenciation exacte des cinq levures, j'ai cru que les données expérimentales qui s'y rattachent en atteindraient un second.

J'espère, en effet, qu'elles apporteront une nouvelle contribution, bien faible il est vrai, à cette question de la nutrition azotée des levures mise à l'étude depuis PASTEUR et dont la complexité a retardé jusqu'à nos jours une mise au point vraiment nette.

Il ne faut pas oublier que l'étude de l'alimentation azotée et de l'alimentation hydrocarbonée est liée d'une façon intime à la nutrition de la cellule de levure, considérée surtout au point de vue de la production des nombreuses diastases qu'elle peut sécréter : diastases protéolytiques, oxydantes, réductrices, dissolvantes, hydrolysantes (cytase, invertine, zymase, maltase, peptase, etc.).

EVANS¹ a résumé d'une façon magistrale ce sujet de l'azote et des levures. Il y a, dit-il, entre les animaux et les végétaux cette grande différence que les premiers simplifient la matière azotée complexe et l'éliminent à l'état de corps peu compliqués, alors que les végétaux font, avec l'ammoniaque et les nitrates, des matières albuminoïdes complexes et n'éliminent pas de matériaux azotés.

1. EVANS : *J. of the fed. Inst. of Brewing*, 1903, t. 9, p. 33.

En suspens depuis l'origine de la microbiologie, l'historique bibliographique est considérable. J'ai cherché à le résumer en tâchant de le rendre cependant aussi complet que possible.

Si l'on considère la composition élémentaire des levures, bien que les résultats soient très variables au point de vue des doses des divers éléments, elle n'en est pas moins constante au point de vue qualitatif.

Retenons seulement comme fait d'ordre quantitatif, que la cellule de levure se signale parmi les autres cellules végétales par sa plus grande richesse en azote.

Dès lors, puisque d'autre part la levure est une cellule vivante, son protoplasme se nourrit et respire, l'azote lui est donc nécessaire.

La levure l'assimile-t-elle directement? Jusqu'ici nous n'en avons aucun indice, il faut donc qu'elle prenne cet azote sous une forme quelconque. Voyons quelles sont les diverses formes d'aliments azotés et les recherches qu'elles ont suscitées, relativement à leur influence particulière sur la fermentation.

D'abord ceux de nature minérale, et, pour commencer, l'azote ammoniacal. Les différents travaux qui ont envisagé la question à un point de vue général sont ceux de KUNCKEL¹, qui observe que la levure est azotée, de FABRONI², qui assimile la levure à une substance azotée.

THÉNARD³ étudie la teneur en azote de la levure prise à des états différents, mais ne peut, à un moment donné, trouver l'état par lequel elle passe. PASTEUR cite DÖBEREINER⁴ comme pouvant être le premier auteur qui a cru trouver cet état dans la forme azote ammoniacal.

DELBRUCK⁵ constate que la teneur du moût en substances azotées solubles diminue pendant la fermentation, mais il n'y a aucune relation entre la multiplication de la levure et son action fermentatrice. Il reconnaît en tous cas que le rendement en levures est proportionnel à la teneur du moût en azote.

CORDIER⁶ place en tête des matériaux azotés du moût une certaine quantité d'albumine (environ 1 gr. par litre) coagulable par la chaleur, l'alcool concentré et les réactifs généraux des albuminoïdes.

Il trouve que la proportion de cette matière albuminoïde n'est que peu réduite dans le moût devenu vin, que cette substance (albumine végétale) constitue la majeure partie de la matière azotée des moûts et des vins. Il calcule que sur 0 gr. 642 d'azote total du moût, 0 gr. 219 vient d'une albumine, 0 gr. 356 de substances inconnues qu'il dénomme peptones vinaïres et 0 gr. 42 de composés ammoniacaux volatils.

1. KUNCKEL : Voir *Traité de Microbiologie* de Duclaux, 1900, t. 3, p. 186.

2. FABRONI : *Ann. de Chim.*, 1799 [1], t. 31, p. 300.

3. THÉNARD : *Ann. de Chim.*, 1803 [1], t. 46, p. 294.

4. PASTEUR : *Ann. de Chim. et Phys.*, 1860 [3], t. 58, p. 367.

5. DELBRUCK : *Woch. f. Brauerei*, 1893, n° 30, p. 810.

6. CORDIER : *Les Maladies microbiennes des vins blancs d'origine champenoise*, Reims, 1906, p. 8.

BOULLANGER¹ constate que l'aération favorise l'absorption d'azote par la levure.

HAYDUCK² a vérifié par l'expérience que, si l'élévation de la température et encore mieux l'aération augmentaient la production de levure, sa teneur en azote diminue et qu'alors elle en fait disparaître davantage du moût. Ceci s'explique en ce que la teneur en azote de la levure augmentant à chaque fermentation, l'accumulation de l'azote entraîne la dégénérescence, et il s'ensuit une diminution de sa faculté d'assimilation de l'azote. Plus un moût est riche en azote, plus la levure en assimile et plus elle dégénère rapidement.

Depuis longtemps, PASTEUR³ dosant l'ammoniaque avant et après fermentation du sucre dans de l'eau de levure de bière, avait trouvé que ce n'est pas à l'état d'ammoniaque que cet azote résiduel est transformé et que de plus l'azote ammoniacal, qui existait dans la liqueur originelle, pouvait disparaître.

Poursuivant ses investigations plus loin, PASTEUR établit que la levure peut assimiler l'azote ammoniacal, là où cette base est l'unique aliment azoté. Elle peut en effet croître et se multiplier dans un liquide sucré où l'azote est fourni uniquement par les sels ammoniacaux. Il ajoute que la levure fait avec l'ammoniaque unie au sucre la synthèse des matières albuminoïdes.

DUCLAUX⁴ transporte le sujet du milieu artificiel au moût de raisin.

Il constate que ce moût renferme toujours une quantité sensible d'azote ammoniacal et que, pendant la transformation du moût en vin, la presque totalité de l'ammoniaque disparaît.

LABORDE⁵ arrive aux mêmes conclusions. Il a trouvé dans le moût de tous les raisins, de petites quantités d'un sel ammoniacal qui varie non seulement d'un cépage à l'autre, mais aussi pour un même cépage avec le lieu d'origine. Cette ammoniaque du moût est absorbée par la levure pendant la fermentation et il n'en reste plus que des traces dans le vin correspondant. Pour une même température, l'azote ammoniacal restant dans le vin varie beaucoup avec les diverses levures; celles de Champagne semblent le moins avides. A température élevée, dans tous les cas, l'assimilation de l'ammoniaque est gênée. La quantité d'ammoniaque doit diminuer à mesure que la maturation avance. Les altérations diverses que subit accidentellement le raisin font diminuer la quantité d'azote ammoniacal contenue dans les moûts.

DESCOFFRES⁶ croit que l'ammoniaque à dose assez forte ne nuit pas à

1. BOULLANGER : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1896, t. 10, p. 597.

2. HAYDUCK : *Zeitschr. f. spir. ind.*, 1881, t. 4, p. 173.

3. PASTEUR : *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1860 [3], t. 58, p. 364.

4. DUCLAUX : *Traité de Microbiologie*. Paris, 1900, t. 3, p. 194.

5. LABORDE : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1898, t. 1, p. 388 et 412.

6. DESCOFFRES : *Thèse Doctorat en pharmacie*. Bordeaux, 1906, p. 95.

la fermentation et que l'azote, sous forme d'ammoniaque non combinée, n'aide probablement pas à la nutrition azotée de la levure. Pour revenir sur un terrain plus théorique, il faut rappeler les très anciennes expériences de DUMAS¹ sur l'influence des substances étrangères sur la fermentation. Parmi les sels minéraux azotés qu'il classe comme donnant :

1° Une fermentation totale plus ou moins rapide, on trouve le phosphate d'ammonium ;

2° Une fermentation partielle et plus ou moins ralentie, le nitrate d'ammonium et le tartatre d'ammonium ;

3° Une interversion plus ou moins avancée sans fermentation : l'azotate de potassium, l'azotate de sodium, le chlorure d'ammonium.

Ce tableau comporte, comme on le voit, l'essai des nitrates, aussi, avant de quitter ce paragraphe de l'azote minéral, il importe de relater les travaux, souvent contradictoires, publiés sur l'influence de cet élément azoté.

DUBRUNFAUT² tend à prouver que la levure présente une activité vitale plus grande dans un milieu où on a mis un peu de nitrate de potasse.

MAYER³ le premier avance que la levure était incapable d'utiliser l'azote des nitrates. Mais cet auteur était parti d'un milieu assez mal approprié et ne s'était pas préoccupé de la pureté de ses semences. LAURENT⁴ reprend ces travaux dans des conditions plus précises et dans ce but s'adresse surtout à la levure végétal. Il trouve d'une façon manifeste que la levure préfère des sels ammoniacaux aux nitrates.

BRIANT⁵ donne la dose de 0 gr. 050 à 0 gr. 060 de nitrate par litre comme quantités qui affaiblissent la levure, donnent des fermentations irrégulières, occasionnelles et une coloration foncée des moûts.

POUR LAURENT⁶ 0 gr. 050 à 0 gr. 100 d'acide nitrique par litre donne des fermentations irrégulières. Cette dose affaiblit la levure ; la coloration et l'acidité de la bière augmentent. Dans certains cas, la levure réduit les nitrates en nitrites. Ceux-ci sont antiseptiques par l'acide azoteux mis en liberté par les acides organiques du moût.

Néanmoins on peut, dit-il, accoutumer la levure à la présence de grandes quantités d'azotate de potassium jusque 0 gr. 30 ‰, les cellules deviennent alors plus petites.

Par contre, DE SMET⁷ combat la théorie d'après laquelle les eaux riches en nitrates amèneraient la dégénérescence de la levure.

1. DUMAS : *C. R. Ac. Sc.*, 1872, t. 75, p. 277.

2. DUBRUNFAUT : *C. R. Ac. Sc.*, 1871, t. 73, p. 200 et 262.

3. MAYER : *Untersuchungen über die alkoolische Gährung*, Heidelberg, 1869, p. 58.

4. LAURENT : *Ann de l'Inst. Pasteur*, 1889, t. 3, p. 362.

5. BRIANT : *J. of the fed. Inst. of Brewing*, 1899, t. 5, p. 372.

6. LAURENT : *Ann de l'Inst. Pasteur*, 1890, t. 3, p. 115.

7. DE SMET : *Communication au Congrès de Bruges*, 1899, relaté dans travail de Briant.

SOUTHBY ¹ trouve que les nitrates en solution diminuent la vitalité de la levure.

MAYER ² de son côté ayant repris ses premiers travaux d'une façon plus précise et plus complète, trouve que les éléments les plus assimilables sont l'asparagine et les peptones diffusibles. Les sels ammoniacaux conviennent moins, les matières albuminoïdes ne sont pas assimilables pas plus que les nitrates.

Avec ce travail, nous arrivons à l'étude des formes azotées complexes : azote amidé et azote protéique.

C'est HAYDUCK ³ qui le premier, commence à faire intervenir non seulement la présence, mais la qualité des aliments azotés. De plus, il remarque que l'activité de la levure augmente avec la richesse en azote. Il mesure cette activité avec un appareil spécial. En outre, il songe à mettre en action l'azote organique. Il essaye l'asparagine, qu'il trouve se comportant comme l'ammoniaque et les peptones comme l'eau de levure.

KUSSEROW ⁴ arrive aux mêmes résultats, mais il est plus explicite dans ses conclusions.

D'autre part, DUCLAUX ⁵ ayant repris ses premières études, fait partir trois fermentations dans des conditions comparatives avec sel ammoniacal et eau de levure (azote organique). Il a obtenu les résultats suivants :

1° L'azote ammoniacal défavorable à la levure végétal est favorable à la levure ferment ;

2° L'eau de levure favorise la levure végétal ;

3° L'addition d'ammoniaque accélère la fermentation et peut même permettre à la levure de se passer de matières organiques.

La forme azote amidé a été surtout étudiée avec l'asparagine. L'action de cet amino-acide fut l'objet de nombreuses recherches. LANGE ⁶ continue celles de HAYDUCK et constate que le séjour dans une solution d'asparagine même très diluée augmente énormément l'activité de la levure et la proportion de zymase. Comme KUSSEROW, il trouve que la nature des composés azotés du moût peut jouer un rôle important sur la forme sous laquelle se dépose la levure. Avec l'asparagine, dépôt poussiéreux ; avec la peptone dépôt floconneux.

Cependant cette dernière influence, qui lui semble être très nette au début de ses recherches, l'est moins dans la suite ; aussi, dans une seconde série d'expériences, il est moins affirmatif et émet l'opinion

1. SOUTHBY : *Practical Brewing*, p. 471.

2. MAYER : *Gährungs Chemie*, Heidelberg, 1906, 6^e édition, p. 129.

3. HAYDUCK : *Zeitsch. f. spir. ind.*, 1880, t. 3, p. 174 ; 1881, t. 4, 173 ; 1882, t. 5, p. 90 ; *Woch. f. Brauerei*, 1905, t. 22, p. 525.

4. KUSSEROW : *Brennerei Zeitung*, 1897, p. 318.

5. DUCLAUX : *Traité de Microbiologie*, 1900, t. 3, p. 195.

6. LANGE : *Woch. f. Brauerei*, 1899, t. 16, p. 49.

que les levures dont le dépôt est granuleux pourraient bien devoir leur agglomération à une précipitation de matière albuminoïde quelconque (matières albuminoïdes provenant du milieu).

STERN¹ fit une étude très complète de la nutrition de la levure, dans laquelle il recherche quel peut être l'effet de variation dans la proportion des matières minérales, sur la récolte des levures, sur l'assimilation de l'azote et sur la fermentation du sucre dans un temps donné.

Pour la partie qui nous intéresse spécialement, cet auteur employa en milieu minéral l'asparagine comme source azotée.

Dans un des points les plus concluants de ses travaux, il montre que si on augmente la concentration du sucre de 10 à 20 %, on augmente l'utilisation de l'azote pris à l'état d'asparagine, en même temps que son action fermentative. Il précise, de plus, le rôle de la quantité de la matière azotée dans la nutrition de la levure. Il essaye d'abord avec le phosphate monopotassique, le sulfate de magnésie, le glucose et l'asparagine; le rendement en levures étant trop peu considérable, il remplace l'asparagine ou par une solution d'extrait de levures ou par une solution de peptone du commerce.

Comme conclusion, avec l'asparagine, l'extrait de levure et la peptone, on trouve qu'à partir d'une certaine limite une augmentation de la quantité d'aliment azoté n'augmente plus le rendement en levure.

Rendement en levure avec asparagine	1 gr. »
— — avec peptone	1 gr. 0
— en extrait de levure	2 gr. 2

Il est à remarquer qu'il se trouve en contradiction avec HAYDUCK, en avançant que des levures contenant des proportions d'azote différentes ont le même pouvoir ferment.

En effet, à partir d'une certaine limite, une augmentation des matériaux qui servent à la nutrition de la levure n'a plus d'action sur la quantité d'azote assimilée. Dès lors, elle n'en n'a pas davantage sur la proportion d'azote que renferme la levure, le poids de celle-ci et celui du sucre restant.

Des travaux de STERN se rapprochent ceux de THOMAS² qui, employant un milieu minéral et, comme forme alimentaire azotée, l'acétamide, l'acétate d'ammonium, l'urée, le carbonate acide d'ammonium, conclut aussi que si l'on augmente la concentration du sucre de 10 à 20 %, on augmente, pour l'ammoniaque, l'utilisation de l'azote par la levure en même temps que son action fermentative. Pour terminer l'historique de l'azote amidé, il faut signaler que PETIT et LABOURASSE³ disent que,

1. STERN : *J. of the chem. Soc.*, 1898, t. 74, p. 183; 1899, t. 75, p. 201; 1903, t. 79, p. 943; *J. of the fed. Inst. of Brewing*, 1902, t. 8, p. 690.

2. THOMAS : *Ann. de la Brass et de la Dist.*, 1902, t. 4, p. 367.

3. PETIT et LABOURASSE : *C. R. Ac. Sc.*, 1900, t. 131, p. 381.

toutes choses égales d'ailleurs, la levure haute vivant dans un liquide reufermant de l'azote ammoniacal et de l'azote asparagine, utilise moins l'azote ammoniacal que la levure basse.

MAYER¹, BIALOBLOCKI et ROSLER² ont émis des opinions assez différentes, que je passerai sous silence, sur l'accommodation que se fait la levure de quelques substances organiques azotées, telles que l'allantoïne, l'urée, l'acide urique, la guanine. En revanche, il y a une bibliographie importante ayant trait à l'azote albuminoïde.

LINTNER³ trouve que la levure puise toujours beaucoup plus d'azote amidé que d'azote protéique. IWANOWSKI⁴, plaçant la levure dans une solution sucrée très riche en peptone, lui fait perdre ses propriétés de ferment, tandis que sa puissance végétative se trouve considérablement augmentée.

BOKORNY⁵ obtient un rendement en levure plus faible quand on passe de la peptone comme source d'azote à l'asparagine et au sulfate d'ammonium.

BEHRENS⁶ additionnant un moût de peptone favorise beaucoup sa fermentation.

LINTNER⁷, WAHL et HANTKE⁸ trouvent que la levure puise dans le moût plus de combinaisons amidées que de protéines, et lui procure ainsi une plus grande richesse en azote. Le premier de ces auteurs, dans une étude générale du rôle des matières azotées en brasserie, dit au sujet du moût que ces matières jouent un rôle considérable comme aliment de la levure. Cet organisme consomme les albumoses et les amides, et de préférence ces derniers corps.

THÉNARD⁹, COLIN¹⁰, PASTEUR¹¹, MAYER¹², BOULLANGER¹³ ont étudié les albuminoïdes vrais comme aliments de la levure. Il résulte de leurs travaux que la caséine, la fibrine, l'ovoalbumine comme unique source d'azote, déterminent une fermentation qui n'est jamais nulle mais extraordinairement pénible. En revanche, avec le sérum sanguin ou musculaire, le sucre fermente presque aussi facilement que s'il était dissous dans un jus naturel.

1. MAYER : *Untersuchungen über die alkoholische Gährung*, 1869, p. 56.

2. BIALOBLOCKI et ROSLER : *Ann. d'Oenologie*, 1870, t. 1, p. 53.

3. LINTNER : *Woch. f. Brauerei*, 1884, t. 1, p. 3; *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1902, t. 5, p. 518.

4. IWANOWSKI : Voir Travaux de Pringsheim dans *Biochemische Zeitschrift*, 1907, t. 3, p. 121 et 286.

5. BOKORNY : *Koch's Jahresbericht*, 1907, t. 13, p. 238.

6. BEHRENS : *Centralb. f. Bakt.*, 1897, t. 3, p. 354.

7. LINTNER : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1902, t. 5, p. 518.

8. WAHL et HANTKE : *American Brewers Review*, 1894, t. 7, p. 492.

9. THÉNARD : *Ann. de Chem.*, 1803, t. 46, p. 294.

10. COLIN : *Ann. de Chem. et de Phys.*, 1825 [2^e], t. 28, p. 128.

11. PASTEUR : *Ann. de Chem. et de Phys.*, 1860 [3^e], t. 58, p. 364.

12. MAYER : *Gährungschemie*. Heidelberg, 1879, p. 132.

13. BOULLANGER : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1897, t. 11, p. 720.

Nous arrivons alors au modernisme de la question et, avant de citer les auteurs qui recherchent surtout l'influence de la forme de l'aliment azoté sur les sécrétions diastasiques, il me semble indiqué de relater un mémoire d'IWANOFF ¹ :

« Tandis que de nombreux auteurs affirment que les matières albuminoïdes jouent un rôle très important pendant la fermentation, lui, au contraire, arrive à conclure à la fin de son travail que la décomposition de la matière albuminoïde ne joue aucun rôle dans la fermentation alcoolique. Il explique la non décomposition des matières albuminoïdes de la levure par la présence de produits accessoires (aldéhydes et éthers) résultant de la décomposition du sucre, qui gênent la transformation de la matière albuminoïde. »

C'est HESS ² qui, le premier, a fait intervenir l'influence de la nutrition azotée sur la production de zymase et examine les résultats différents obtenus avec des levures différentes. Dans tous les cas, l'asparagine donne une suractivité au pouvoir ferment, c'est-à-dire, en somme, à la sécrétion de la zymase. C'est elle qui, comparativement avec l'eau de levure et la peptone, convient le moins à la multiplication des cellules.

D'après ce qui a été établi précédemment, il semblerait acquis que lorsque la levure a de la matière azotée en abondance à sa disposition, elle manifeste une grande activité. Cependant pour O'SULLIVAN ³ l'augmentation d'activité de la levure en présence des matériaux azotés s'expliquerait, parce que la présence de ces derniers détermine une sécrétion plus abondante de zymase.

LANGE ⁴ a étudié, en plus, les moyens par lesquels cette matière azotée peut être transformée en zymase. Les substances qui produisent l'effet attendu sont précisément celles auxquelles HAYDUCK a rapporté une grande valeur nutritive : asparagine, phosphate de potassium, sulfate de magnésium, peptone. De plus, ces corps indiqués n'agissent pas comme des aliments, mais ils influent sur l'état physiologique de la cellule.

Enfin nous arrivons maintenant aux travaux tout à fait récents ayant trait à la question.

PRINGSHEIM ⁵ a étudié l'influence de la constitution chimique de l'aliment azoté sur le pouvoir ferment de la levure. La levure, d'après lui, est capable de constituer ses globules à l'aide de matières azotées de constitutions très variées. Mais elle n'arrive à faire fermenter le sucre qu'on lui offre, que si elle a à sa disposition, comme source d'azote, une matière azotée renfermant le groupe : $(-NH-CH-CO)$.

1. IWANOFF : *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1904, t. 42, p. 464.

2. HESS : *Zeitsch. f. d. ges. Brauw.*, 1898, t. 21, p. 430.

3. O'SULLIVAN : *J. of the chem. Soc.*, 1899, t. 17, p. 559.

4. LANGE : *Woch. f. Brauerei*, 1899, t. 16, p. 49.

5. PRINGSHEIM : *Ber. der deutsch. chem. Ges.*, 1907, t. 30, p. 4048.

Ainsi en employant comme aliment azoté les corps suivants : asparagine, glutamine, glycocolle, alanine, tyrosine, acide hippurique, le départ de la fermentation s'effectue d'autant plus rapidement que la chaîne qui caractérise l'acide aminé est plus longue :

Avec la leucine, deux jours ; le glycocolle, deux semaines ; le glycocolle, deux semaines.

Comme source d'azote permettant à la levure sa multiplication en présence de sucre mais sans fermentation, il cite : acide sulfanilique, acide métanilique, aniline, benzamide, et en général les composés ne renfermant pas le groupement ci-dessus formulé.

À côté de ces résultats si intéressants se rangent les travaux d'EHRICH¹, qui ont une importance considérable. Cet auteur a montré clairement que la levure ne s'assimile les composés amidés comme aliments azotés que lorsqu'elle les a désagrégés en deux parts :

Une première, qu'elle rejette et qui constitue les alcools supérieurs, et c'est là l'origine des huiles de fusel ; une autre qu'elle s'assimile, l'ammoniaque qui est son aliment azoté de prédilection. Cette ammoniaque est, par ce phénomène vital, transformée dans la suite en matière albuminoïde.

Nous trouvons ainsi, dans ce phénomène de fermentation produit par ce végétal minuscule, la synthèse de la molécule chimique la plus compliquée.

Au point de vue pratique ainsi se trouvent indiqués pour la première fois les moyens d'obtenir un maximum ou minimum d'huile de fusel, problème que se pose depuis longtemps l'industrie de l'alcool.

Dans un travail étendu et tout récent, mais peut-être complexe, PRINGSHEIM² probablement en continuation de ses premiers travaux sur l'influence du groupe



et des remarquables travaux d'EHRICH, a envisagé cette question dans sa plus large amplitude, dans ses plus petits détails et sous ses très divers aspects. Peut-être faut-il trouver là le manque de netteté que produit ce travail. Précédé d'un historique très détaillé de la question, c'est certes celui qui fournit le plus de documents sur la nutrition azotée de la levure à l'heure actuelle.

De résumer m'exposerait à des redites de faits signalés dans l'étude bibliographique précédente, aussi je me bornerai à ne transmettre que les conclusions nouvelles de ses travaux les plus récents.

Dans la seconde partie de ses recherches, l'auteur a étudié l'influence de diverses sources d'azote à diverses concentrations sur l'action fermentative de la levure.

1. EHRICH : *Ber. der deutsch. chem. Ges.*, 1907, t. 40, p. 1027.

2. PRINGSHEIM : *Biochemische Zeitschrift*, 1907, t. 3, p. 121 et 286.

Il a choisi la peptone comme représentant les produits de dégradation peu avancés de la matière albuminoïde, l'asparagine et la leucine, ceux des produits de dégradation profonde, les sels ammoniacaux comme source d'azote minéral. Ses conclusions, qui sont en quelque sorte comme le résumé de toutes les données connues sur la nutrition azotée de la levure, sont les suivantes : avec la peptone, la vitesse de la fermentation va en diminuant régulièrement à mesure que la concentration de l'azote diminue.

Pour les autres sources d'azote prises isolées, il constate le phénomène inverse. La vitesse de fermentation a son maxima entre une limite allant de 0,04 à 0,08 % d'azote ; au-dessous et au-dessus, la fermentation est moins active.

Avec le mélange de divers corps azotés, on obtient une fermentation plus active qu'en employant une seule source d'azote à concentration d'azote égale.

La vitesse de fermentation a comme facteur important la nature de la levure mise en travail.

Etudiant les relations de la quantité d'azote que l'on expérimente avec la levure, considérée comme végétal (en ensemençant très peu de levure), ou comme levure ferment quand elle produit uniquement la fermentation (multiplication supprimée par un ensemencement large), elle se comporte de même, et la teneur en azote du milieu est sans influence sensible sur la richesse en azote de la levure.

Il termine en disant que, si on augmente artificiellement la richesse en azote d'un moût naturel, les levures,ensemencées faiblement ou largement, à la disposition desquelles on aura mis de la peptone, de l'asparagine, du sulfate d'ammonium donneront une fermentation où l'on peut réduire fortement (plus de moitié) la production du fusel.

Dans un même moût, toutes choses égales d'ailleurs, il faut tenir compte de la variété de levure employée.

On ne saurait trop attirer l'attention sur cette dernière considération de PRINGSHEIM. En concordance du reste avec les expériences qui vont suivre, elle fortifie de plus en plus cette opinion, qu'en biologie de levures, il faut, avant d'avancer des conclusions générales d'expérimentation, ne jamais perdre de vue la spécificité propre, la physiologie particulière de chaque espèce et de chaque organisme.

II. — Influence des différentes formes d'aliments azotés sur la nutrition des levures.

A. — EXPÉRIENCES EN MILIEU COMPLEXE

La question de la nutrition azotée de la levure a donc fait un grand pas dans ces dernières années.

L'idée dominante qui ressort des faits actuellement acquis, est que cette nutrition est intimement liée à la production de matière albuminoïde, du protoplasme cellulaire de la levure, de la matière zymasique.

Dès lors, l'idée de la considérer sous les formes : azote amidé, azote nitrique, azote ammoniacal, azote albuminoïde, azote albumine soluble, doit être rattachée à celle de la constitution de la matière albuminoïde.

Aussi, il est plus rationnel d'expérimenter comme aliment azoté pour la levure :

1° La peptone représentant les produits de dégradation peu avancée de la molécule protéique ;

2° L'asparagine comme type de composé amino-acide provenant d'une dégradation plus profonde ;

3° Les substances azotées minérales, telles que les sels ammoniacaux qui sont les derniers débris et, dès lors, les plus simples de la dislocation de la matière albuminoïde végétale.

A cette dernière catégorie se rattache l'azote nitrique qui, bien qu'azote minéral, est assimilé par la levure d'une façon toute différente de celle de l'azote ammoniacal.

Parmi les conclusions importantes tirées des expériences, il en est une particulièrement intéressante, qui concorde du reste avec les diverses confirmations énoncées dans l'historique général. C'est l'existence, pour chaque espèce de levures bien différenciées, d'aptitudes tout à fait spéciales vis-à-vis de leur nutrition azotée.

Une première série d'expériences préparatoires a été faite avec un moût complexe, stérilisé, contenant des quantités diverses, soit d'une solution de peptone, d'asparagine ou de phosphate d'ammonium. Ces quantités représentaient pour chaque variété d'aliment une même teneur exacte en azote.

Cette expérience a été ensuite complétée par d'autres plus scientifiques, cette première n'étant pas rigoureuse, étant donné un milieu d'essai aussi complexe que celui de bouillon de touraillon ou le moût de raisin ; l'azote y existe sous des formes assimilables très variées et dont on ignore et la teneur et la nature chimique exactes.

Deux levures ont été expérimentées, la levure II, levure à dépôt fin, et la levure V, levure à dépôt grumeleux.

Les expériences ont été faites en prenant pour chaque essai 100 cm³ de moût titrant 20 gr. % de sucre réducteur contenu dans des ballons identiques qui furent partagés en cinq séries.

Dans chaque série, on a essayé des doses croissantes du même aliment azoté, et la progression rapportée aux mêmes chiffres d'azote était la même dans les trois.

Pour établir ces teneurs en azote, j'ai pris comme base les doses successives de 0 gr. 50, 1 gr., 2 gr. et 6 gr. de phosphate d'ammonium pour 1.000 cm³ de moût, ce qui m'a indiqué les chiffres suivants :

	1 ^{re} SÉRIE avec phosphate d'ammonium	2 ^e SÉRIE avec asparagine anhydre	3 ^e SÉRIE avec solution de peptone dosée au Kjeldahl	AZOTE % représenté
1 ^{re} dose. . . .	0 gr. 050	0 gr. 0365	1 cc ³	0 gr. 0106
2 ^e —	0 gr. 100	0 gr. 1130	2 cc ³	0 gr. 0212
3 ^e —	0 gr. 200	0 gr. 2260	4 cc ³	0 gr. 0424
4 ^e —	0 gr. 600	0 gr. 4520	6 cc ³	0 gr. 0848

Les deux levures ont étéensemencées d'une façon identique, et pour les deux les conditions de la fermentation ont été les mêmes.

Expérience avec la levure II.

BALLON TÉMOIN : *Sans addition d'aliment azoté.*

Sur 23 gr. % de sucre, il disparaît 16 gr. donnant 8% d'alcool.

1^{re} SÉRIE : *Addition de phosphate d'ammonium.*

PHOSPHATE D'AMMONIUM	ALCOOL
1 ^{re} dose : 0 gr. 50 ‰. Sur 23 gr. % de sucre, il disparaît 17 gr. donnant	10%5
2 ^e dose : 1 gr. — — — — —	11%0
3 ^e dose : 2 gr. — — — — —	9%0
4 ^e dose : 6 gr. — — — — —	7%7

2^e SÉRIE : *Addition d'asparagine en quantités correspondantes
aux doses suivantes de phosphate d'ammonium :*

	ALCOOL
1 ^{re} dose : 0 gr. 50 ‰. Sur 23 gr. % de sucre, il disparaît 16 g. 2 donnant	9%5
2 ^e dose : 1 gr. — — — — —	11%0
3 ^e dose : 2 gr. — — — — —	9%5
4 ^e dose : 6 gr. — — — — —	7%5

3^e SÉRIE : *Addition de peptone en quantités correspondantes
aux doses suivantes de phosphate d'ammonium :*

	ALCOOL
1 ^{re} dose : 0 gr. 50 ‰. Sur 23 gr. % de sucre, il disparaît 17 gr. donnant	10%5
2 ^e dose : 1 gr. — — — — —	10%5
3 ^e dose : 2 gr. — — — — —	11%0
4 ^e dose : 6 gr. — — — — —	11%7

Expérience avec la levure V.

BALLON TÉMOIN : *Sans addition d'aliment azoté.*

Sur 20 gr. $\%$ de sucre, il disparaît 18 gr. donnant. 10°5 d'alcool.

1^{re} SÉRIE : *Addition de phosphate d'ammonium.*

PHOSPHATE D'AMMONIUM			ALCOOL
1 ^{re} dose : 0 gr. 50 $\%$. Sur 20 gr. $\%$ de sucre, il disparaît 17 gr. donnant			10°5
2 ^e dose : 1 gr.	—	—	18 gr. — 11°0
3 ^e dose : 2 gr.	—	—	18 gr. — 11°25
4 ^e dose : 6 gr.	—	—	18 gr. — 10°5

2^e SÉRIE : *Addition d'asparagine en quantités correspondantes aux doses suivantes de phosphate d'ammonium :*

			ALCOOL
1 ^{re} dose : 0 gr. 50 $\%$. Sur 20 gr. $\%$ de sucre, il disparaît 17 gr. 5 donnant			9°5
2 ^e dose : 1 gr.	—	—	18 gr. 5 — 11°5
3 ^e dose : 2 gr.	—	—	17 gr. 5 — 9°8
4 ^e dose : 6 gr.	—	—	17 gr. 7 — 10°0

3^e SÉRIE : *Addition de peptone en quantités correspondantes aux doses suivantes de phosphate d'ammonium :*

			ALCOOL
1 ^{re} dose : 0 gr. 50 $\%$. Sur 20 gr. $\%$ de sucre, il disparaît 18 gr. donnant			10°0
2 ^e dose : 1 gr.	—	—	19 gr. — 11°5
3 ^e dose : 2 gr.	—	—	18 gr. — 11°5
4 ^e dose : 6 gr.	—	—	19 gr. 5 — 11°5

Comme interprétation de ces deux tableaux, on constate de suite une inégalité de résultats avec les deux levures.

Ceux-ci sont meilleurs dans les trois séries pour la levure V, bien que la suraddition d'aliment azoté ne semble pas la favoriser d'une façon très sensible.

Tout au contraire, cet effet est favorable à la levure II, et cela, sous quelque forme qu'on lui présente l'azote. On constate que, du titre alcoolique 8°3, qui est celui du témoin, on arrive à 11°7 avec disparition presque totale du sucre.

La peptone est l'aliment préféré des deux levures, car ce sont les séries avec ce composé qui donnent les moyennes de sucre disparu et d'alcool formé les plus élevées.

Bien que les variations dans les doses de cette source d'azote ne semblent pas avoir une répercussion correspondante dans la production d'alcool, il est intéressant de remarquer qu'une forte proportion de peptone est surtout très bien supportée par chacune des deux levures. On verra plus loin qu'il en est tout autrement pour d'autres formes d'aliment azoté, et on peut remarquer dès maintenant qu'il existe pour le phosphate d'ammonium et pour l'asparagine une dose *optima* à fournir à la levure.

Cette constatation est très nette pour la levure II. Les quantités de ces éléments favorablement assimilés, sont voisines de 0 gr. 200 d'azote ‰, ce qui correspond à 1 gr. ‰ de phosphate d'ammonium et 1 gr. 13 ‰ d'asparagine.

Ce fait que l'azote ammoniacal semble plaire à la levure à égalité avec l'azote amidé est en rapport avec les dernières conceptions d'EUR-LICH et de PRINGSHEIM.

B. — EXPÉRIENCES EN MILIEU DÉFINI

Mais, comme je l'ai dit plus haut, cette expérience doit être considérée comme une pose de jalons pour les recherches plus précises qui vont suivre.

La grande critique à lui faire porte sur la complexité du moût employé quant à sa teneur et à la forme de ses éléments azotés.

Voulant dès lors employer un milieu de composition définie, il était naturel de penser à constituer un milieu artificiel.

Si j'insiste un peu sur la constitution de ce milieu, c'est dans l'intention de combattre certaines idées qui porteraient à croire que, vu les nombreuses formules de milieux artificiels imaginés pour l'étude de la fermentation alcoolique, on ne peut avoir que l'embarras du choix et que les fermentations effectuées dans ces conditions donnent des résultats très satisfaisants, qui en permettent une facile interprétation.

Je crois intéressant, avant de donner la composition d'un nouveau milieu minéral, de dresser le tableau de tous ceux employés jusqu'ici par divers expérimentateurs pour l'étude des levures.

1^o TABLEAU DES DIFFÉRENTS MILIEUX UTILISÉS POUR L'ÉTUDE DES LEVURES.

MILIEUX DE PASTEUR.		Phosphate neutre de potassium.	
<i>1^{re} formule.</i>			
Cendres de 1 gr. de levures.	0 gr. 075	Sulfate de magnésium.	2 gr. »
Sucre	10 gr. »	Phosphate bicalcique . . .	1 gr. »
Eau	100 cm ³	Eau	0 gr. 10
			200 cm ³
<i>Formule modifiée.</i>		MILIEU DE LAURENT.	
Cendres de levures	1 gr. »	Sulfate d'ammonium. . . .	4 gr. 71
Carbonate d'ammonium. . .	1 gr. »	Phosphate d'ammonium. . .	0 gr. 75
Sucre	10 gr. »	Sulfate de magnésium. . . .	0 gr. 10
Eau	100 cm ³	Eau	1000 cm ³
MILIEUX DE COHN.		MILIEU DE DUCLAUX.	
<i>1^{re} formule.</i>		Phosphate bi-potassique. . .	0 gr. 1
Cendres de levures	1 gr. »	Sulfate de magnésium. . . .	0 gr. 1
Lactate d'ammonium	1 gr. »	Phosphate tricalcique	0 gr. 1
Eau	100 cm ³	Eau sucrée à 15 ‰ de sucre	
		candi.	20 cm ³
<i>2^e formule.</i>			
Tartrate d'ammonium. . . .	2 gr. »		

MILIEU DE STERN.

Asparagine	3 gr. »
Phosphate bi-potassique. . .	1 gr. »
Sulfate de chaux.	0 gr. 20
Glucose vrai.	Q. V.
Eau.	Q. S. pour 1000 cm ³

MILIEU DE THOMAS.

Phosphate bi-potassique . .	2 gr. 50
Sulfate de magnésie. . . .	0 gr. 50
Glucose	Q. V.
Eau.	Q. S. pour 1000 cm ³

MILIEU DE NÆGELI.

Eau	100 cm ³
Sucre	15 gr. »
Nitrate d'ammonium. . . .	1 gr. »
Phosphate de potassium. . .	0 gr. 50
Phosphate tricalcique . . .	0 gr. 05
Sulfate de magnésium. . . .	» »

MILIEUX DE HAYDUCK.

1^{re} formule.

Sucre candi	400 gr. »
Asparagine	2 gr. 50
Eau	1000 cm ³
Solution minérale.	50 cm ³
contenant par litre :	
Phosphate acide de potasse. .	50 gr. »
Sulfate de magnésium. . . .	17 gr. »

2^e formule.

Eau distillée.	400 cm
Sucre candi	10-15 gr.
Peptone	1 gr. »
Phosphate acide de potasse. .	0 gr. 50
Phosphate tricalcique. . . .	0 gr. 05
Sulfate de magnésium. . . .	0 gr. 25

3^e formule.

Eau distillée.	400 cm ³
Sucre candi	10-15 gr.
Peptone	1 gr. »
Extrait de viande	0 gr. 50 %

MILIEU DE MAYER.

Sucre	15 gr. »
Phosphate acide de potas- sium.	0 gr. 50
Sulfate de magnésium. . . .	0 gr. 25
Phosphate de chaux.	0 gr. 05
Tartrate d'ammonium. . . .	1 gr.
Eau	100 cm ³

MILIEUX DE WILDIERS, AMAND, HENRY.

Eau	200 cm ³
Saccharose	20 gr. »
Sulfate de magnésium. . . .	0 gr. 50
Chlorure de potassium . . .	0 gr. 50
Chlorure d'ammonium	0 gr. 50
Phosphate trisodique	0 gr. 50
Carbonate de calcium. . . .	0 gr. 10

MILIEU DE KAYSER ET BOUILLANGER.

Biphosphate de chaux. . . .	1 gr. »
Phosphate d'ammonium. . . .	2 gr. »
Bitartrate de potassium. . .	2 gr. »
Sulfate de magnésium. . . .	0 gr. 10
Solution miellée.	1000 cm ³

MILIEU DE NASTUKOFF.

Solution de saccharose à	
10 %	1000 cm ³
et 3 gr. du mélange suivant :	
Phosphate d'ammonium. . . .	7 gr. 30
Tartrate neutre d'ammo- nium.	24 gr. 50
Tartrate acide de potas- sium.	3 gr. 30
Chaux hydratée	2 gr. »
Chlorure de sodium	0 gr. 20
Acide tartrique.	18 gr. 50

MILIEU DE KOSSOWICZ.

Eau saccharosée à 5 % con- tenant :	
Chlorure de potassium . . .	0 gr. 04
Phosphate d'ammonium. . . .	0 gr. 04
Sulfate de magnésium. . . .	0 gr. 04
Phosphate de chaux.	0 gr. 04

MILIEU DE DESCOFFRES.

Saccharose	150 gr. »
Phosphate bi-potassique. . .	0 gr. 25
Sulfate de magnésie.	0 gr. 50
Phosphate d'ammonium. . . .	10 gr. »
Crème de tartre.	15 gr. »
Eau	Q. S. pour 1000 cm ³

MILIEU DE CORDIER.

Saccharose	125 gr. »
Phosphate d'ammonium. . . .	15 gr. »
Tartrate double d'ammo- nium et potassium.	8 gr. »
Crème de tartre.	5 gr. »
Sulfate de magnésie.	1 gr. »
Bouillon peptoné	15 cm ³
Eau	900 cm ³

2° DISCUSSION DE CES DIFFÉRENTES FORMULES.

Le premier grief à formuler contre certains milieux, tels que ceux de PASTEUR, formule primitive et formule modifiée, ceux de COHN, c'est qu'ils contiennent des cendres de levures. Celles-ci apportent des quantités indéterminées d'éléments chimiques inconnus, en quantité très faible, il est vrai, mais qui, néanmoins, peuvent avoir une conséquence importante lorsqu'il s'agit de microorganismes dont la susceptibilité est si grande dans leurs affinités chimiques.

On peut en trouver une preuve très évidente dans les résultats récents obtenus par MM. KAYSER et MARCHAND avec des traces de sels de manganèse ajoutées aux mouls sucrés.

D'autres formules, comme celles de HAYDECK et CORDIER, comportent, la première, du bouillon de LIEBIG, la seconde, du bouillon peptoné. On ne peut, dès lors, les considérer comme des liquides de nature essentiellement minérale.

Si, d'autre part, LAURENT et STERN n'ont fait entrer dans la composition de leurs milieux que des constituants minéraux définis, comme parmi eux figurent des sels ammoniacaux, ils ne pouvaient être employés dans cette étude. Il était, en effet, de toute nécessité, pour le sujet qui nous occupe, de pouvoir faire varier à volonté la nature de l'aliment azoté.

Ce sont ces considérations qui m'ont amené à établir un liquide minéral chimiquement défini et dans lequel l'on pourrait introduire l'azote sous ses différentes formes.

3° LIQUIDE MINÉRAL ARTIFICIEL NON AZOTÉ POUR L'ÉTUDE DES LEVURES.

Composition :

Phosphate bi-potassique	4 gr. »
Sulfate de magnésium	0 gr. 50
Sulfate de calcium anhydre	0 gr. 25
Tartrate acide de potassium	0 gr. 50
Glucose pur	5 gr. »
Saccharose cristallisé	200 gr. »
Eau distillée	Q. S. pour 1000 cm ³

Préparation. — Après dissolution presque complète, porter le liquide à 110°, tous les sels se dissolvent. Filtrer au papier et stériliser entre 110 et 115° pendant quinze minutes.

On obtient de cette façon un liquide limpide et incolore, à la condition toutefois de ne pas dépasser la température de stérilisation indiquée.

1. KAYSER et MARCHAND : *C. R. Ac. Sc.*, 1907, t. 144, p. 714.

Critique : Le milieu a une réaction acide. Il se rapproche beaucoup comme constitution de ceux de DESCOFFRES, NASTUKOFF, KAYSER et BOULLANGER, DUCLAUX.

Il diffère surtout et essentiellement du premier par l'addition de chaux ; du second par la suppression du chlorure de sodium ; du troisième par l'emploi d'eau distillée ; du dernier par sa réaction acide, due au tartrate acide de potasse.

Si l'on considère les diverses expériences faites avec les levures en milieu minéral, on constate souvent qu'il n'y a aucune indication à signaler, soit sur le mode d'ensemencement, soit sur les résultats numériques trouvés, notamment pour la quantité d'alcool formé.

Sans empiéter sur les chapitres suivants, on peut cependant faire ressortir que, dans ce milieu, avec des aliments azotés variables et des levures différentes, ensemencées dans la teneur de cinq gouttes de culture en touraillon pour 150 cm³ de liquide, j'ai pu obtenir des rendements de 9 et 10° d'alcool. Il faut encore noter que le titre alcoolique trouvé est toujours plus faible que le titre d'alcool formé réellement, attendu que les expériences ont été faites dans des ballons simplement fermés au coton et qui séjournèrent des semaines à l'étuve de 23°, toutes conditions fatales d'évaporation.

Constitution. — Pour les substances chimiques nécessaires à la levure pour qu'elle puisse vivre et se développer, les opinions ne concordent guère.

Ainsi, MAYER¹ dit que le phosphate de potassium et le sulfate de magnésium peuvent remplacer toutes les autres matières minérales dans l'alimentation de la levure. LINTNER² pense que le sodium et le fer ne sont pas nécessaires. MOLISCH³ prétend que le fer est indispensable et que le calcium ne l'est pas. WEHMER⁴ doute de la nécessité du fer. SEYFFERT⁵ dit que l'absence de sels de chaux amène la dégénérescence de la levure.

Comme on peut le juger par comparaison, ce milieu minéral est un des moins compliqués.

Il renferme comme éléments simples : H, O, S, P, C, K, Ca, Mg.

Comme groupement atonique : P²O⁵ à l'état de phosphate, SO³ à l'état de sulfate, puis le tartrate acide de potassium qui donne la réaction acide.

Ce liquide nourricier ne contient donc pas de fer, pas de sodium sinon à l'état de traces, pas de chlorure, pas de carbonate.

Il renferme par contre du calcium et cet élément, exclu de certaines

1. MAYER : *Untersuchungen über die alkoolische Gährung*, Heidelberg, 1869, p. 56.

2. LINTNER : *Lehrbuch der Bierbrauerei*, p. 427.

3. MOLISCH : *Zeitsch. f. d. ges. Brauw.*, 1895, t. 18, p. 149.

4. WEHMER : *Beiträge zur Kenntniss einheimischer Pilze*, 1893, t. 1, p. 158.

5. SEYFFERT : *Zeitsch. f. d. ges. Brauw.*, 1896, t. 19, p. 318.

formules, est sinon de toute nécessité, du moins très important.

L'expérience suivante le démontre en même temps qu'elle fait voir l'inutilité des corps précédents et l'action favorable du tartrate acide de potassium.

J'ai mis en fermentations parallèles deux milieux. Le premier dont la composition, adoptée pour la suite, est indiquée ci-dessus et un second constitué ainsi :

Phosphate bi-potassique.	1 gr. »
Sulfate de magnésium	0 gr. 50
Glucose	5 gr. »
Saccharose	200 gr. »
Eau de Seine	Q. S. pour 1000 cm ³

Les points intéressants qui le différencient d'avec le précédent sont l'absence du tartrate acide, la présence de chlorures, du sodium, des traces de fer et seulement des traces de chaux, tous éléments existant dans l'eau de Seine.

Les deux séries d'expériences ont été faites en ajoutant comme aliment azoté du phosphate d'ammonium, du sulfate d'ammonium et de l'aspartate d'ammonium,

La levure ensemencée fut la levure II.

La supériorité de la première formule sur la seconde en temps que milieu favorable à la fermentation ne fait aucun doute, comme on peut le juger par le tableau suivant :

	SOURCE D'AZOTE		
	Sulfate d'ammonium 2 gr. ‰	Phosphate d'ammonium 2 gr. ‰	Aspartate d'ammonium 2 gr. ‰
<i>Expérience avec le 1^{er} milieu.</i>			
Sucre disparu sur 22 gr. ‰	16 ^s 20	18 ^s 80	19 ^s 20
Alcool	7 ^o 0	8 ^o 5	9 ^o 0
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0 ^s 680	0 ^s 750	0 ^s 830
<i>Expérience avec le 2^e milieu.</i>			
Sucre disparu	13 ^s 60	15 ^s 0	16 ^s 20
Alcool	5 ^o 5	6 ^o 5	7 ^o 0
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0 ^s 880	0 ^s 860	0 ^s 910

Il était évidemment nécessaire d'ajouter un aliment azoté car, comme on le sait depuis longtemps, l'azote est indispensable à la levure.

Les cinq levures, en effet, ensemencées faiblement dans le milieu

base n'ont donné aucune fermentation. Cependant il ne faudrait pas oublier le fait, également établi, que la levure ensemencée très largement peut emprunter l'azote qui lui est nécessaire par un phénomène d'autophagie et faire fermenter le sucre.

4° LA QUESTION DU BIOS.

La donnée précédente relative à la quantité de culture de levures ensemencée n'est pas en effet négligeable, car elle touche à la question si controversée du Bios de WILDIERS¹.

Cet auteur a prétendu le premier ne pouvoir observer aucun développement de levure, quand on ensemence un milieu minéral avec cinq gouttes d'une culture de levure en moût de bière. Dans ces conditions expérimentales la levure ne pourrait vivre, parce qu'elle n'a pas à sa disposition dans le milieu où elle se trouve cet élément spécial nécessaire à son développement.

Je rappellerai tout d'abord que M. FERNBACH², en 1904, ne voulait admettre qu'après de nouvelles expérimentations l'existence plus que problématique du composé nommé Bios par WILDIERS.

Plus tard, ce même auteur continuant toujours à mettre en doute le Bios de WILDIERS, avance que, si la fermentation est négative en milieu minéral, ce résultat est facilement explicable. Il suffit en effet d'ensemencer dans chaque ballon d'expérience une seule cellule de levure, tout au moins cela est-il probable. Cela l'est encore moins, quand on ensemence quelques gouttes renfermant un nombre considérable de levures qui se trouvent à tous les états physiologiques.

Aussi, cette question du Bios fut-elle l'objet de controverses nombreuses.

HENRY³ a trouvé que, s'il est vrai que les milieux qui ne renferment que des matières minérales et du sucre sont loin de constituer des milieux parfaits aussi favorables que le liquide Raulin l'est pour l'*Aspergillus Niger*, il a pu néanmoins obtenir, par très faible ensemencement, une culture très développée dans le milieu de WILDIERS. Cependant il affirme la conclusion de cet auteur en disant qu'il est nécessaire au développement de la levure, dans ces conditions, de la substance hypothétique Bios.

Dans ces expériences Henry n'emploie pas de levures de vin, la nature de l'eau utilisée n'est pas indiquée, il dit lui-même que son milieu forme un dépôt abondant. Enfin il ne donne aucun chiffre comme titre alcoolique et départ de sucre.

1. WILDIERS : *La Cellule*, 1901, t. 18, p. 313.

2. FERNBACH : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1904, t. 7, p. 385.

3. HENRY : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1902, t. 5, p. 129.

KOSSOWICZ¹ a obtenu dans un milieu minéral une multiplication au bout de quelques semaines, mais n'a pu voir à l'œil nu de dégagement d'anhydride carbonique.

L'étude de cette question, continuée par HENRY², est ensuite reprise par Abel AMAND³. Tous deux ne parviennent pas encore à s'entendre sur son interprétation définitive. Celui-ci prétend que l'on ne connaît pas de milieu minéral qui soit pour la levure l'équivalent des meilleurs milieux organiques.

De toute cette polémique et tout, particulièrement des derniers travaux d'AMAND, il faut conclure avec M. FERNBACH⁴ que ces expériences établissent simplement un fait qu'on connaissait depuis longtemps. Il y a dans l'eau de levures des substances alimentaires pour la levure et qui permettent une culture florissante dans un milieu minéral pour certaines levures, auxquelles ce milieu seul ne convient pas.

C'est aussi la façon dont PRINGSHEIM⁵ interprète ces faits, car il ne voit dans ce transport de la levure en milieu artificiel qu'une simple question d'adaptation. Ces vues concordent avec ses expériences personnelles dans lesquelles il montre que la levure peut s'habituer aux milieux minéraux, pour y vivre ensuite mieux qu'auparavant. Elle arrive alors à s'y développer, alors même qu'on n'ensemence qu'une cellule.

Enfin, tout récemment, DEVLOO⁶ est parti de cette conclusion générale à laquelle des recherches précédentes avaient donné lieu, et dit que la cellule de levure ne peut pas élaborer son protoplasme lorsqu'elle n'a à sa disposition que du sucre et des sels minéraux. Ni l'azote ammoniacal, ni l'azote nitrique ne lui suffisent, il lui faut une source d'azote organique. Cette source d'azote organique est d'une constitution très complexe, et comme il suffit qu'il y en ait dans le liquide de culture une quantité infime, on comprend que sa nature soit restée inconnue. Le seul doute qui subsistait, dit-il, au sujet de la créance à accorder au Bios, c'était que cette substance n'était pas mieux définie. Cet auteur cherchant alors à combler cette lacune a trouvé que c'était une base monoazotée.

Elle entre elle-même comme noyau fondamental dans un corps gras phosphoré qui ressemble à la lécithine, sans pour cela avoir de rapport chimique avec la choline au côté de laquelle elle se trouve toujours.

1. KOSSOWICZ : *Zeitschrift für das landwirtschaft Versuchsweiser in Oesterreich*, 1903, t. 6, p. 27.

2. HENRY : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1903, t. 6, p. 27.

3. A. AMAND : *La Cellule*, 1902, t. 20, p. 249, et 1904, t. 21, p. 320.

4. FERNBACH : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1904, t. 7, p. 385.

5. PRINGSHEIM : *Centralb. f. Bakt.*, 1906, t. 16, p. 111.

6. DEVLOO : *La Cellule* 1906, t. 23, p. 361.

La remarque signalée plus haut de la non-fermentation permet justement d'apporter une nouvelle contribution à cette question du Bios. En effet, les cinq levures de champagne, cultivées en bouillon de touraillon très faible, ayant complètement fini de fermenter depuis quelques jours, furent ensemencées à la dose de trois gouttes pour 40 cm³ de liquide minéral non azoté. Les milieux d'ensemencement furent placés dans l'étuve de 25°. Examinés pendant douze jours consécutifs, dans aucun d'eux on n'observe de fermentation ou même de développement de levures.

Alors seulement, au moyen d'une pipette graduée et stérile, chacun reçoit la même quantité d'une solution à 2 gr. ‰ de phosphate d'ammonium.

Le lendemain, la levure II, la levure IV, la levure V étaient en pleine fermentation; la levure I et la levure III le furent le surlendemain.

Les quantités de sucre restant dans le milieu fermenté, nulles pour la levure II et la levure IV, équivalentes à des traces pour la levure V et à 2 gr. 50 ‰ environ pour la levure I et la levure III, montrent que les cinq levures firent disparaître près de 20 gr. ‰ de saccharose dans ces conditions.

Puis, chacune des levures prises dans ces milieux précédents, complètement fermentés, fut respectivement ensemencée à la dose de quatre gouttes pour 50 cm³ de liquide, dans de nouvelles quantités du milieu minéral qui, cette fois, était azoté par 4 gr. ‰ de phosphate d'ammonium.

Expérience relative au Bios.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 23 gr. ‰ . . .	15 ⁸ 74	19 ⁸ 79	11 ⁸ 95	19 ⁸ 57	18 ⁸ 09
Alcool.	6°7	10°	5°3	9°5	9°
Poids de levures	0 ⁸ 144	0 ⁸ 136	0 ⁸ 156	0 ⁸ 144	0 ⁸ 128
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0,911	0,686	1,300	0,734	0,707
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	6,4	6,4	5,6	6,75	6,06

Ces résultats montrent que toutes les levures ont fait disparaître chacune au moins 10 gr. ‰ de sucre. Autre constatation intéressante : c'est que cette expérience met très bien en relief leur tempérament réciproque.

La levure I et la levure III ont donné une mauvaise fermentation, ayant surtout vécu comme levure végétal. La levure IV, la levure V

et surtout la levure II dont l'organisme s'adapte très facilement à tout changement de régime ont fourni par contre une très bonne fermentation qui est arrivée à produire 10° d'alcool dans le cas de la levure IV.

Tandis que cette levure a donné selon l'habitude un chiffre d'acidité élevé, la levure III elle aussi n'a pas dérogé à sa coutume, en produisant l'effet tout opposé.

5° INFLUENCE DES DIVERSES FORMES D'AZOTE DANS LA NUTRITION DE LA LEVURE.

Avec ce milieu ainsi définitivement constitué, j'ai fait quatre séries d'expériences avec les cinq levures de champagne, en changeant dans chaque série la nature de l'aliment azoté. Celui-ci fut introduit suivant des quantités correspondantes chacune exactement à la même dose d'azote équivalente à 0 gr. 424 $\frac{0}{100}$. Les formes d'éléments azotés expérimentées furent :

- Pour l'azote albuminoïde, une solution de peptone ajoutée de façon à donner au milieu une teneur de 0 gr. 0424 $\frac{0}{100}$ d'azote;
- Pour l'azote amidé, une solution d'asparagine donnant 0 gr. 226 $\frac{0}{100}$ d'asparagine;
- Pour l'azote ammoniacal, une solution de sesquicarbonat d'ammonium donnant 0 gr. 200 $\frac{0}{100}$ de carbonate d'ammonium;
- Pour l'azote nitrique, une solution d'azotate de soude donnant 0 gr. 256 $\frac{0}{100}$ d'azotate de soude.

Le choix du sesquicarbonat d'ammonium a été dicté par la prise en considération de l'influence du radical acide, associé à l'ammoniaque, sur la levure. Celle de l'anhydride carbonique doit être dans ce cas négligeable. Il n'en serait pas de même par exemple avec le phosphate ou le sulfate d'ammonium. C'est ainsi qu'avec le premier de ces sels, il y aurait augmentation de P^2O^5 dans le moût et c'est à considérer comme l'ont montré certains biologistes, notamment M. KAYSER¹ dans son étude de l'action des phosphates d'ammonium, de potassium, de calcium sur la fermentation alcoolique.

Comme azote nitrique j'ai pris l'azotate de sodium, l'ion sodium étant à faible dose un élément reconnu indifférent à la levure.

Dans tous les ballons mis en expérience, la matière azotée, dissoute dans l'eau distillée et stérilisée à part, a été ajoutée aseptiquement au milieu minéral stérile froid.

Ceci est de toute première importance, car de cette façon on ne s'expose pas :

A des doubles décompositions (sulfates, phosphates, et bases alcalino-terreuses);

A des hydrolyses (asparagine);

1. KAYSER: *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1901, t. 4, p. 350.

A des décompositions partielles (sels ammoniacaux);

A des réductions (nitrates);

A des transformations possibles (peptone).

Toutes réactions qui seraient susceptibles de se produire en portant à 115 ou 120° le mélange de ces substances fait préalablement à la stérilisation.

Pour le carbonate d'ammonium, il faut pour stériliser ses solutions opérer en ballon scellé, autrement il se dissocie complètement en donnant de l'ammoniaque dont le pouvoir alcalin est si sensible aux levures.

Les quantités de levures ensemencées furent de cinq gouttes de culture récente dans du bouillon de touraillon, pour 150^{cm³} de liquide minéral.

Expérience avec la peptone.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 21 gr. % . . .	18 ⁵ 3	21 ⁵ 0	14 ⁵ 6	21 ⁵ 0	21 ⁵ 0
Alcool.	8 ⁵ 5	10 ⁵ 0	7 ⁵ 3	10 ⁵ 2	10 ⁵ 5
Poids de levures pour 100 cm ³ de moût.	0 ⁵ 156	0 ⁵ 281	0 ⁵ 140	0 ⁵ 350	0 ⁵ 201
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0,85	1,33	0,95	1,66	0,95
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	3,3	3,3	2,9	3,6	3,0
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	0,60	0,65	0,57	0,63	0,61

Expérience avec l'asparagine.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 21 gr. % . . .	15 ⁵ 0	18 ⁵ 9	13 ⁵ 0	20 ⁵ 50	21 ⁵ 0
Alcool.	6 ⁵ 0	8 ⁵ 7	5 ⁵ 8	9 ⁵ 5	9 ⁵ 5
Poids de levures pour 100 cm ³ de moût.	0 ⁵ 146	0 ⁵ 110	0 ⁵ 135	0 ⁵ 128	0 ⁵ 158
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0,97	0,58	1,05	0,62	0,75
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	3,4	3,9	2,7	4,2	3,15
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,79	1,07	1,10	2,01	1,24

Expérience avec le carbonate d'ammonium.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 21 gr. % . .	19 ^s 0	20 ^s 0	19 ^s 0	19 ^s 0	17 ^s 5
Alcool.	8 ^o 0	8 ^o 5	7 ^o 5	8 ^o 7	7 ^o 0
Poids de levures pour 100 cm ³ de moût.	0 ^s 128	0 ^s 122	0 ^s 110	0 ^s 162	0 ^s 125
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0,67	0,61	0,57	0,83	0,71
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	3,1	3,0	3,15	3,3	2,9
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre	1,3	1,2	1,6	2,0	1,3

Expérience avec l'azotate de soude.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 21 gr. % . .	4 ^s 0	3 ^s 0	4 ^s 0	2 ^s 0	3 ^s 0
Alcool.	1 ^o 5	1 ^o 0	1 ^o 5	0 ^o 5	1 ^o 0
Poids de levures pour 100 cm ³ de moût.	0 ^s 098	0 ^s 081	0 ^s 066	0 ^s 153	0 ^s 100
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	2,45	2,7	1,65	7,65	3,33
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	1,5	1,5	1,5	1,35	1,45

Si les meilleures fermentations ont été obtenues avec l'azote albuminoïde, par contre l'azote ammoniacal a donné des résultats toujours bons avec toutes les levures et presque identiques pour chacune d'elles.

Tout au contraire, l'azote amidé est un aliment azoté qui s'assimile d'une façon toute différente selon les organismes.

Pour les levures auxquelles il semble favorable, l'effet de l'asparagine détermine d'aussi bonnes fermentations que la peptone.

Quant à l'azote nitrique, au point de vue de son action sur le pouvoir ferment, aucune de ces cinq levures n'est capable de se l'assimiler. Les chiffres de sucre disparu, alcool formé, acides produits, montrent qu'il n'y a pas eu, ou à peu près, de fermentation alcoolique.

Routefois, en tant qu'aliment azoté susceptible de participer au développement de la levure végétal, il peut être absorbé; certaines levures même, telles que la levure V et surtout la levure IV, semblent très bien s'en accommoder.

Bien qu'il soit impossible de comparer les chiffres d'alcool dans les trois expériences de fermentation et qu'on ne puisse établir une comparaison que dans une même série, il semble néanmoins que l'aliment

azoté mis sous la forme de peptone est celui qui donne le plus fort rendement alcoolique.

Les poids de levures formés dans l'expérience avec le sel ammoniacal sont très faibles, ils varient pour 100 gr. de sucre disparu entre 0 gr. 6 et 0 gr. 8 environ. Au contraire, la multiplication de la levure est très favorisée dans la série à la peptone et le chiffre précédent arrive dans les cinq cas à égalier pour le moins 1 gr. environ de levure.

L'acidité totale reste constante malgré le changement de l'aliment azoté, et même elle semble si peu influencée qu'on retrouve dans les trois séries l'allure particulière à chaque levure; les levures IV et II sont celles qui donnent le plus d'acidité, les levures V et III celles qui en produisent le moins.

Par contre, la formation des acides volatils subit des variations. Celles-ci sont peu importantes dans le cas de l'alimentation azotée albuminoïde, où l'on constate pour les cinq levures une acidité volatile très faible. Elle devient alors très forte dans la série au carbonate d'ammonium et surtout dans celle à l'asparagine, où l'on trouve des chiffres représentant les acides volatils formés valant le double et même plus, de ceux produits par les mêmes levures, avec la peptone comme source de nutrition azotée.

La levure IV donne toujours beaucoup d'acides volatils.

Si l'on veut en plus tirer de ces résultats des données permettant d'établir un milieu nutritif complet pour les levures, et qui soit à la fois minéral et chimiquement défini, on pourra le composer ainsi :

Phosphate bi-potassique.	1 gr. »
Sulfate de magnésium.	0 gr. 50
Sulfate de calcium anhydre.	0 gr. 25
Sesquicarbonate d'ammonium.	2 gr. »
Tartrate acide de potassium.	0 gr. 50
Glucose pur	5 gr. »
Saccharose cristallisé	200 gr. »
Eau distillée. Q. S. pour	1.000 cm ³

Toutefois, il sera essentiel de prendre toutes les précautions opératoires relatées ci-dessus et tout particulièrement celles relatives à l'emploi du sesquicarbonate d'ammonium qui peut suffire à lui seul, dans un milieu artificiel, à assurer la nutrition azotée des levures. Elles se l'assimilent d'une façon généralement uniforme en donnant de bonnes fermentations alcooliques.

Si on établit, en effet, un tableau comparatif de l'action comme source azotée des trois formes d'azote : azote albuminoïde, azote amidé, azote ammoniacal, sur les cinq levures de champagne, on voit que :

Pour la levure I, l'aliment le plus favorable est *l'azote ammoniacal* et le moins favorable *l'azote amidé*;

Pour la levure II, l'aliment le plus favorable est soit l'*azote albuminoïde, ammoniacal ou amidé*;

Pour la levure III, l'aliment le plus favorable est l'*azote ammoniacal* et le moins favorable l'*azote albuminoïde ou amidé*;

Pour la levure IV, l'aliment le plus favorable est soit l'*azote albuminoïde, ammoniacal ou amidé*;

Pour la levure V, l'aliment le plus favorable est soit l'*azote albuminoïde ou amidé* et le moins favorable est l'*azote ammoniacal*.

La nutrition azotée ammoniacale est donc favorable à quatre levures sur cinq, ce qui doit la faire considérer, sinon comme véritablement supérieure à l'azote albuminoïde et à l'azote amidé, du moins comme certainement équivalente et susceptible de contribuer comme unique source d'aliment azoté aux meilleures fermentations.

CHAPITRE III

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES SELS AMMONIACaux DANS LA NUTRITION AZOTÉE DE LA LEVURE

I. — Historique de la nutrition azotée ammoniacale de la levure.

Ayant ainsi étudié l'influence de l'azote pris à l'état de sel ammoniacal comparativement avec l'azote peptone, azote amidé, azote nitrique, il était tout indiqué de compléter cette étude par celle de l'influence particulière des différents sels ammoniacaux.

Dans cette question, il ne faut pas envisager exclusivement que le facteur azote, on doit aussi tenir compte de tous les éléments de la combinaison et considérer que, dans la dissociation des divers sels par la levure, la nature des ions mis en liberté joue aussi un rôle.

L'étude de l'influence spéciale des divers sels ammoniacaux sur la fermentation alcoolique a été amorcée par Dumas¹.

Avec le phosphate il obtint une fermentation totale plus ou moins rapide. Avec le nitrate et le tartrate une fermentation partielle et plus ou moins ralentie. Avec le chlorure une intervention plus ou moins avancée, sans fermentation.

LAURENT² en fit une étude plus précise, mais il s'adressa surtout à la levure végétal, l'objectif de ses recherches étant de reconnaître la préférence de celle-ci pour les sels ammoniacaux contre les nitrates.

D'autres expérimentateurs ont utilisé les sels d'ammonium, mais la plupart avaient surtout en vue la comparaison de la forme azote ammoniacal avec celles des autres sources azotées, C'est cette raison qui explique la fréquence de l'addition du phosphate d'ammonium dans de nombreux milieux de culture.

1. DUMAS : *C. R. Ac. Sc.*, 1872, t. 75, p. 277.

2. LAURENT : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1889, t. 3, p. 362.

Toutefois, son influence personnelle a été étudiée par M. KAYSER¹. Cet auteur a montré que le phosphate d'ammonium est un facteur qui peut jouer un grand rôle dans la transformation du sucre en glycérine sous l'influence du ferment alcoolique. Cette glycérine donne plus de moelleux et plus d'extrait au vin.

JACQUEMIN² donne les doses pratiques pour utiliser ce sel en viniculture. Il trouve que 10 gr. par hectolitre sont suffisants pour activer une fermentation alcoolique languissante et transformer en alcool les dernières traces de sucre d'un vin.

M. MANCEAU³ dans une étude très approfondie de la prise de mousse des vins de Champagne a étudié l'action des sels minéraux sur cette seconde fermentation.

Relativement au phosphate d'ammonium il conclut que, sur la fermentation en vase clos, sous pression de gaz carbonique, il n'est pas plus favorable que le phosphate, le sulfate et le chlorure de potassium. Il ajoute qu'il pourrait même montrer en envisageant certaines questions que son influence est par ailleurs nettement nuisible.

CORDIER⁴ est du même avis sur ce sujet. Il a obtenu des résultats qui lui permettent de faire en quelque sorte la part de la substance azotée nécessaire et suffisante pour l'obtention rationnelle d'un moussage.

Il signale, à ce propos, l'erreur où l'on peut tomber en ajoutant au vin du phosphate d'ammonium.

Par contre, M. DESCOFFRES⁵ fait remarquer que, dans son milieu artificiel, l'augmentation de la dose de phosphate d'ammonium accélère toujours la fermentation, ce qui est indiqué par la production active d'anhydride carbonique. Il ajoute que l'affinité de la levure pour un sel ammoniacal va très loin. En effet, lorsque dans un moût naturel on ajoute un sel ammoniacal, la levure lui emprunte l'azote de préférence à celui qui se trouve à l'état normal dans les moûts de raisin.

ELION⁶ le premier, parvint à accélérer les fonctions de la zymase par l'addition à la levure d'un mélange de phosphate monopotassique et de phosphate diammonique. Il observe de plus que l'effet produit est variable d'une levure à l'autre.

LAURENT⁷ dans son étude de la levure végétal, effectuée en milieu minéral, signale parmi les divers corps auxquels une levure haute peut

1. KAYSER : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1901, t. 4, p. 350.

2. JACQUEMIN : *Les fermentations rationnelles*. Nancy, 1900, p. 457.

3. MANCEAU : *Bull. du Lab. expér. de viticulture et d'œnologie de la maison Moët et Chandon*, 1903, t. 2, p. 69.

4. CORDIER : *Les maladies microbiennes des vins blancs d'origine champenoise*. Reims, 1906, p. 6.

5. DESCOFFRES : *Thèse de Doctorat en pharmacie*. Bordeaux, 1904, p. 70.

6. ELION : *Centralb. f. Bakt.*, 1893, t. 14, p. 53 et 97.

7. LAURENT : *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1889, t. 3, p. 362.

emprunter son azote le succinate d'ammonium. Au contraire la levure n'a pu assimiler le tannate et le gallate d'ammonium.

Il a de plus fait entrer le sulfate d'ammonium dans son milieu minéral.

Comme on l'a vu dans le second chapitre, le tartrate d'ammonium figure dans ceux de COHN, de MAYER, de CORDIER; le carbonate dans celui de PASTEUR; le nitrate dans celui de NÆGELI; le chlorure dans ceux de WILDIERS, HENRY, AMAND.

THOMAS¹ a utilisé dans ses recherches sur la nutrition azotée le bicarbonate et l'acétate d'ammonium.

II. — Influence générale des sels ammoniacaux dans la fermentation alcoolique.

L'étude de tous les sels ammoniacaux, minéraux et organiques appliquée à cinq levures comporterait un travail de grande envergure et, de la diversité et complexité des résultats, il est probable qu'on ne pourrait tirer que des conclusions très diffuses.

Voulant dès lors me limiter, j'ai fait une expérience éliminatoire en prenant une seule levure et huit sels ammoniacaux, quatre minéraux les plus courants : le phosphate, le sulfate, l'azotate, le chlorure. Puis quatre organiques : le succinate et l'aspartate liés par leur groupement acide aux acides aminés, composés si importants au point de vue de la synthèse et de la désagrégation des matières albuminoïdes; le tartrate et le citrate, dont les acides correspondants existent dans un grand nombre de moûts provenant de fruits sucrés.

La levure choisie fut la levure II dont le facile tempérament semble s'accommoder très bien des milieux les plus variés et des conditions les plus diverses.

Les doses des différents sels ont été déterminées d'après les poids moléculaires, rapportés au même chiffre d'azote, en prenant comme base la teneur de 2 gr. de phosphate d'ammonium pour 1000 cm³ de moût.

Tableau des différentes doses des sels expérimentés.

Sulfate d'ammonium :			
SO ⁴ (NH ⁴) ²	132 (28 d'azote) ajouté en raison de 2 gr. ‰		
Phosphate di-ammonique :			
PO ⁴ (NH ⁴) ² H	132 (28 d'azote)	—	2 gr.
Azotate d'ammonium :			
NO ³ NH ⁴	80 (14 d'azote)	—	2 gr. 42
Chlorure d'ammonium :			
ClNH ⁴	53,5 (14 d'azote)	—	1 gr. 62

1. THOMAS : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1901, t. 4, p. 367.

Aspartate d'ammonium :			
$\text{COOH}-\text{CH}^2-\underset{\text{NH}^2}{\text{CH}}-\text{COONH}^4$ }	150 (28 d'azote)	ajouté en raison de	2 gr. 27
Succinate d'ammonium :			
$\text{COONH}^4-\text{CH}^2-\text{CH}^2-\text{COONH}^4$. . .	152 (28 d'azote)	—	2 gr. 3
Tartrate d'ammonium :			
$\text{COONH}^4-\text{CHOH}-\text{CHOH}-\text{COONH}^4$.	184 (28 d'azote)	—	2 gr. 78
Citrate d'ammonium :			
$\text{CH}^2-\text{COH}-\text{COH}-\text{CH}^2$ }	226 (28 d'azote)	—	3 gr. 42
$\text{COONH}^4-\text{COONH}^4-\text{COONH}^4$ }			

Résultats obtenus avec la levure II.

	SELS							
	Sulfate	Phosphate	Azotate	Chlorure	Aspartate	Succinate	Tartrate	Citrate
Sucre disparu sur 22 gr. o/o	16°0	19°0	17°0	17°0	19°0	17°5	15°5	15°0
Alcool.	7°0	8°5	8°0	8°5	8°75	7°25	7°0	6°5
Poids de levures pour 100 cm ³ de moût. . .	0°110	0°141	0°135	0°133	0°160	0°145	0°148	0°161
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0,68	0,75	0,80	0,76	0,83	0,83	1,02	1,05
Acidité totale, en acide tartrique par litre. .	3,7	4,0	4,0	3,6	4,0	4,0	3,0	4,0

Comme allure générale de la fermentation, les sels minéraux ont donné des fermentations beaucoup plus lentes et moins spontanées que celles produites par les sels organiques.

Ces derniers et tout particulièrement le citrate et le tartrate favorisent la multiplication de la levure.

L'aspartate est celui de ces divers sels ammoniacaux qui a présidé à la meilleure fermentation.

Le phosphate est presque aussi favorable et, constatation curieuse, le chlorure fournit des résultats identiques. On verra en effet dans la suite que l'action de ce sel est loin d'être la même avec d'autres levures.

Si l'on considère les taux les plus élevés qui viennent ensuite, comme départ de sucre et alcool formé, on trouve se plaçant ensemble le succinate et l'azotate. Cette levure semble s'assimiler sans aucune gêne le nitrate comme aliment azoté.

Bien mieux, pour une quantité égale de sucre disparu, c'est l'azotate qui donne le plus d'alcool.

L'action du sulfate et du tartrate paraît être très voisine, sauf pour le poids de levure presque deux fois plus fort avec le sel organique.

Le citrate est le sel ammoniacal le moins apprécié par cette levure dans ces conditions.

III. — Influence particulière de faibles et fortes doses de quelques sels d'ammonium sur les levures de Champagne.

Partant de ces données, j'ai continué mes recherches en essayant les cinq levures de Champagne et en ne gardant que les sels suivants :

Dans une première expérience, j'ai employé pour 1000 cm³ de liquide minéral sans azote des doses faibles, équivalentes à :

Chlorure d'ammonium.	1 gr. 60
Phosphate —	2 gr. »
Aspartate —	2 gr. 30
Azotate —	2 gr. 40
Tartrate —	2 gr. 80

Dans une seconde expérience, j'ai essayé les doses fortes en ajoutant pour 1000 cm³ de milieu minéral non azoté les doses suivantes :

Chlorure d'ammonium	6 gr. »
Phosphate et aspartate.	7 gr. »
Azotate et tartrate	8 gr. »

Influence du phosphate d'ammonium.

1^{re} EXPÉRIENCE : Action de 2 gr. ‰ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. ‰ . .	15 [±] 0	19 [±] 0	18 [±] 0	14 [±] 0	16 [±] 0
Alcool.	5 [±] 0	7 [±] 5	7 [±] 0	6 [±] 0	6 [±] 5
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0 [±] 850	0 [±] 750	0 [±] 700	0 [±] 960	0 [±] 670
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	3,6	4,0	3,0	3,5	3,8
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,09	1,30	1,11	0,93	1,10

2^e EXPÉRIENCE : Action de 7 gr. ‰ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. ‰ . .	19 [±] 0	17 [±] 5	14 [±] 0	16 [±] 0	10 [±] 5
Alcool.	8 [±] 0	8 [±] 0	5 [±] 0	7 [±] 5	4 [±] 5
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0 [±] 650	0 [±] 900	0 [±] 550	0 [±] 920	1 [±] 400
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	6,5	6,1	7,5	4,9	4,6
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre	1,01	1,40	2,15	0,70	0,97

Tandis qu'une variation, même importante, de la quantité de ce sel ne paraît pas influencer la levure II, une faible dose convient très bien à la levure III. Pour celle-ci, par contre, une forte proportion de cet élément lui est nettement nuisible, ce qui au contraire favorise considérablement la levure I. C'est aussi le cas, moins marqué cependant, pour la levure V et la levure IV.

Le phosphate est avec l'aspartate ceux de ces divers sels ammoniacaux qui donnent le plus d'acidité.

Mais, tandis que, pour le premier, la quantité d'acides volatils formés, sauf pour la fermentation de la levure III, varie peu avec le changement de doses, en présence de fortes proportions de phosphate d'ammonium, il y a une augmentation importante des acides fixes. Elle semble due pour l'aspartate à la formation d'une plus grande quantité d'acides volatils.

Ce sel, favorable à la levure I, ne paraît pas être très prisé par la levure V, et, bien qu'il constitue en général une excellente source d'azote pour les levures, il ne faut pas perdre de vue qu'elles se l'adaptent chacune d'une façon toute particulière et suivant des quantités très différentes.

Influence de l'azotate d'ammonium.

1^{re} EXPÉRIENCE : Action de 2 gr. ‰ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. ‰ . .	485	1780	980	1080	1080
Alcool	200	700	300	400	400
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	18400	08800	18300	18200	18210
Acidité totale, en acide tartrique par litre	2,3	4,0	2,4	2,3	2,4
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre	0,82	1,21	0,80	0,89	0,80

2^e EXPÉRIENCE : Action de 8 gr. ‰ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. ‰ . .	485	1180	1180	1085	885
Alcool	200	500	600	400	302
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	28300	18000	08800	18000	18300
Acidité totale, en acide tartrique par litre	2,2	3,0	3,0	2,5	3,7
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre	0,80	1,4	1,08	1,62	0,80

Ce composé comparé aux autres sels ammoniacaux n'est pas un bon aliment azoté, et même, lorsqu'il se trouve être en forte proportion, il est nettement nuisible aux ferments alcooliques.

Cependant, il est important de constater qu'à faible dose, certaines levures semblent tirer un assez bon profit de cet aliment azoté dans lequel cependant l'azote est engagé dans une combinaison nitrrique.

Par contre, la levure I ne s'assimile pas l'azotate d'ammonium, et la mauvaise influence exercée par des petites quantités de nitrate sur son pouvoir ferment ne fait que croître avec l'augmentation de ce sel.

Une autre particularité intéressante, c'est le poids considérable de levures formées dans tous les cas où les cinq levures ont donné de mauvaises fermentations et cela, même avec la levure I. Ces cryptogames se comportant en végétaux supérieurs, absorberaient avec avidité l'acide nitrrique pour la construction de leur édifice végétatif.

Influence du chlorure d'ammonium.

1^{re} EXPÉRIENCE : Action de 1 gr. 60 ‰ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. ‰ . .	5 ^s 0	16 ^s 0	7 ^s 0	17 ^s 0	14 ^s 7
Alcool.	2 ^o 0	8 ^o 5	3 ^o 0	8 ^o 75	7 ^o 0
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0 ^s 193	0 ^s 133	0 ^s 174	0 ^s 165	0 ^s 228
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	3,0	3,6	3,0	4,7	4,1
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,07	1,50	1,41	1,74	1,43

2^e EXPÉRIENCE : Action de 6 gr. ‰ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. ‰ . .	3 ^s 25	8 ^s 7	7 ^s 0	7 ^s 0	3 ^s 84
Alcool.	1 ^o 25	4 ^o 0	3 ^o 0	3 ^o 5	1 ^o 5
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	2 ^s 600	2 ^s 900	1 ^s 500	2 ^s 000	1 ^s 700
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	2,3	3,5	2,55	3,7	2,25
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,43	1,60	0,70	1,50	0,40

L'action de ce sel sur les cinq levures de Champagne montre, d'une façon très nette, quelles différences profondes résidant dans des considérations d'ordre biologique, existent entre ces cinq organismes.

Si l'on juge de l'effet produit sur la levure II, lorsqu'elle ne trouve que de petites quantités de ce composé comme source d'azote, on peut le considérer aussi favorable que le phosphate et l'aspartate. Si, d'autre part, on n'envisage que son influence sur la levure I, c'est évidemment un très mauvais aliment azoté.

Chaque levure se l'adapte donc bien selon une aptitude spéciale et particulière.

Toutefois, son action se nivelle pour toutes et elle devient nettement très nocive quand les levures se trouvent en présence de 6 gr. pour 1.000 cm³ de chlorure d'ammonium.

La prise en considération d'une dose optima s'impose donc tout particulièrement pour ce sel.

Influence de l'aspartate d'ammonium.

1^{re} EXPÉRIENCE : Action de 2 gr. 30 ‰ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. ‰ . .	19 ⁵ 5	19 ⁵ 0	19 ⁵ 5	19 ⁵ 0	21 ⁵ 0
Alcool.	8 ⁵ 5	8 ⁵ 5	9 ⁵ 0	8 ⁵ 3	9 ⁵ 5
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0 ⁵ 760	0 ⁵ 830	0 ⁵ 570	0 ⁵ 640	0 ⁵ 850
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	3,0	3,8	2,9	3,0	3,2
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,10	1,23	1,51	1,92	1,80

2^e EXPÉRIENCE : Action de 7 gr. ‰ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. ‰ . .	16 ⁵ 0	20 ⁵ 5	14 ⁵ 0	21 ⁵ 0	20 ⁵ 5
Alcool.	6 ⁵ 0	7 ⁵ 0	4 ⁵ 5	8 ⁵ 0	7 ⁵ 0
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	0 ⁵ 700	0 ⁵ 480	0 ⁵ 630	0 ⁵ 450	0 ⁵ 550
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	4,1	4,3	3,4	5,1	4,3
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,42	1,51	1,20	2,83	1,82

C'est le sel ammoniacal de choix pour les levures, et cela dans des limites très larges de proportions.

Tout en constatant que la levure IV en présence d'une forte dose, à fait disparaître la presque totalité du sucre en donnant 8° d'alcool et

une acidité élevée, on voit qu'en général les petites quantités de ce composé donnent d'excellents résultats.

Si les levures ont en trop à leur disposition, non seulement on n'obtient pas de meilleures fermentations, mais cela semble plutôt les gêner.

C'est le composé ammoniacal qui détermine dans tous les cas la production de la plus grande quantité d'acides volatils, mais si l'on considère les départs de sucre, on trouve d'excellents résultats :

Deux fois 21 gr. disparus sur 22 $\frac{\circ}{\circ}$, deux fois 20 gr. 5 et deux fois 17 gr. 5.

Influence du tartrate d'ammonium.

1^{re} EXPÉRIENCE : Action de 2 gr. 80 $\frac{\circ}{\circ}$ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. $\frac{\circ}{\circ}$. . .	18 $\frac{5}{10}$	14 $\frac{5}{10}$	10 $\frac{5}{10}$	12 $\frac{5}{10}$	11 $\frac{5}{10}$
Alcool.	8 $\frac{0}{10}$	6 $\frac{5}{10}$	4 $\frac{5}{10}$	5 $\frac{0}{10}$	4 $\frac{5}{10}$
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	1 $\frac{5}{10}$ 120	1 $\frac{5}{10}$ 020	1 $\frac{5}{10}$ 480	1 $\frac{5}{10}$ 410	1 $\frac{5}{10}$ 450
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	3,5	3,0	3,0	2,9	3,0
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,30	0,81	0,80	0,92	0,73

2^e EXPÉRIENCE : Action de 8 gr. $\frac{\circ}{\circ}$ de ce sel.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. $\frac{\circ}{\circ}$. . .	16 $\frac{5}{10}$	18 $\frac{5}{10}$	19 $\frac{5}{10}$	19 $\frac{5}{10}$	10 $\frac{5}{10}$
Alcool.	6 $\frac{5}{10}$	7 $\frac{5}{10}$	8 $\frac{0}{10}$	8 $\frac{0}{10}$	4 $\frac{0}{10}$
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu.	1 $\frac{5}{10}$ 300	0 $\frac{5}{10}$ 810	0 $\frac{5}{10}$ 850	1 $\frac{5}{10}$ 100	1 $\frac{5}{10}$ 700
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	3,9	4,0	4,2	4,0	3,3
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,20	1,11	1,11	1,22	1,0

Bien que son action favorisante ne soit pas équivalente à celle du sel précédent, elle est cependant indiquée par les expériences précédentes, mais alors, dans des conditions de proportions tout à fait opposées, puisque ce sont les doses élevées de ce composé qui ont donné les meilleures fermentations avec les levures II, III, IV.

Son influence se distingue de l'action des autres sels ammoniacaux,

par une faible production d'acides volatils et par un très fort rendement en poids de levures par rapport à la quantité de sucre disparu.

Dans l'examen des résultats indiqués dans les tableaux précédents, il ne faut pas attacher une trop grande importance aux chiffres indiquant l'alcool. Rapportés chacun à la quantité de sucre correspondante ils sont beaucoup trop faibles, mais, comparés les uns aux autres, ils montrent des différences qui concordent avec celles que l'on trouve dans les départs de sucre. Vu les conditions expérimentales, il y a fatalement des pertes d'alcool par évaporation, lesquelles sont variables avec chaque expérience.

Si l'on examine les tableaux précédents, on constate qu'en général l'azote sous forme de sels ammoniacaux donne de meilleurs résultats quand les levures en trouvent de faibles quantités à leur disposition. Ce fait, moins marqué pour les sels ammoniacaux organiques que pour les sels minéraux, est tout particulièrement visible avec l'azotate et le chlorure.

Sauf pour le tartrate d'ammonium, qui influe d'une façon toute spéciale sur la multiplication de la levure, et l'aspartate, dont l'action sur le poids de levures obtenu pour 100 gr. de sucre disparu ne semble pas très accusée, pour les autres sels, leur présence en forte proportion l'augmente beaucoup. Le développement de la levure est ainsi favorisé, au détriment de son pouvoir ferment; ainsi, si ce pourcentage dépasse 1 gr., c'est l'indice d'une mauvaise fermentation, il reste beaucoup de sucre, il se forme peu d'alcool, la levure se comporte surtout comme un simple végétal.

IV. — Influence des différents sels ammoniacaux sur chaque levure.

La levure I est très sensible à la présence d'azotate. Son activité comme ferment augmente avec des doses croissantes de phosphate.

Le chlorure constitue pour elle un véritable antiseptique même en faible dose.

Elle possède une faculté d'assimilation maximum pour des doses optima de tartrate et d'aspartate.

Son assimilation de l'azote ammoniacal est délicate et très variable suivant le sel d'ammonium employé.

Les résultats correspondants aux meilleures fermentations de cette levure sont fournis par :

7 ‰ de phosphate, où 21 gr. de sucre sont disparus.
2 ‰ d'aspartate, où 19 gr. 50 — — — — —

La levure II se caractérise par une remarquable faculté d'assimilation des sels ammoniacaux comme unique source d'azote.

Cette propriété est tellement constante qu'elle donne d'excellentes fermentations dans des moûts où elle ne trouve comme aliment azoté que de faibles quantités de chlorure ou même d'azotate, résultats qui sont loin de se généraliser avec les autres levures.

Toutefois, elle manifeste une préférence pour l'aspartate dont elle fait une large consommation et pour le phosphate dont une faible teneur semble la satisfaire.

Les résultats correspondants aux meilleures fermentations de cette levure sont fournis par :

7 ‰ d'aspartate, où 20 gr. 50 de sucre sont disparus.
2 ‰ de phosphate, où 19 gr. — —

La levure III nous fournit l'exemple très net de la nécessité de connaître les qualités biologiques particulières à chaque organisme pour le choix de leur alimentation.

En effet, on peut constater que tandis que cette levure mise en présence d'une petite quantité de phosphate détermine une bonne fermentation, lorsqu'elle en a trop à sa disposition elle se trouve gênée. C'est au contraire l'effet inverse que lui produit le tartrate.

C'est celle des 5 levures qui s'assimile le moins bien les fortes doses d'aspartate. Quant à son attitude envers le chlorure, bien que ce composé lui semble moins néfaste qu'à la levure I, elle paraît incapable de trouver dans cette source d'azote l'activité spéciale qui lui est nécessaire pour faire fermenter le sucre.

Les résultats correspondants aux meilleures fermentations de cette levure sont fournis par :

7 ‰ de tartrate, où 19 gr. 50 de sucre sont disparus.
2 ‰ d'aspartate, où 19 gr. 50 — —

La levure IV en général a besoin de beaucoup d'azote ammoniacal, sauf pour le chlorure, lequel en faible proportion lui permet de donner une bonne fermentation, mais qui à hautes doses lui est tout à fait défavorable. Elle le supporte même moins bien que l'azotate et on retrouve dans l'attitude égale de cette levure pour des teneurs quelconques en nitrates un tempérament très résistant.

* L'aspartate est son aliment de choix.

Les résultats correspondants aux meilleures fermentations de cette levure sont fournis par :

7 ‰ d'aspartate, où 21 gr. de sucre sont disparus.
7 ‰ de tartrate, où 19 gr. 50 — —

La levure V, qui s'est montrée dans les expériences précédentes sur

la nutrition azotée générale celle des 5 levures dont le pouvoir assimilateur pour l'azote amidé était le plus grand, semble encore mettre cette propriété en évidence en montrant une préférence très marquée pour l'aspartate d'ammonium sur les autres sels. Ceux-ci sont très faiblement assimilés par cette levure, qui préfère du reste en trouver de faible quantités.

Le tartrate et l'azotate et surtout le chlorure lui sont tout à fait défavorables à hautes doses.

Les résultats correspondants aux meilleures fermentations de cette levure sont fournis par :

2 ‰ d'aspartate, où 21 gr. de sucre sont disparus.
7 ‰ d'aspartate, où 20 gr. 50 — —

Pour faire ressortir davantage l'attitude de chacune de ces 5 levures, il est possible de résumer les faits précédents en quelques lignes qui montrent bien que chacune d'elles possède des aptitudes biologiques très nettement différenciées les unes des autres. En effet, on peut, dans une conclusion finale, adapter sur chacun de ces cinq sels ammoniacaux une levure qui se l'assimile de telle façon, que les résultats finaux des fermentations se trouveront être aussi identiquement bons. Ce sera le cas :

Du phosphate	pour la levure I ;
De l'azotate	— II ;
Du tartrate	— III ;
Du chlorure	— IV ;
De l'aspartate	— V.

V. — Influence de la variation des doses de phosphate d'ammonium sur les levures.

Des expériences précédentes relèvent deux observations intéressantes. D'abord sur la levure I, qui donne une fermentation faible en présence de petites quantités de phosphate d'ammonium, tandis qu'elle devient très active et plus complète avec une forte proportion. Puis la levure III qui, dans ces conditions, fournit des résultats directement opposés. Ces considérations m'ont amené à faire deux expériences parallèles en fournissant à ces deux levures des doses croissantes de phosphate d'ammonium.

Expérience avec la levure I.

	DOSES DE PHOSPHATE D'AMMONIUM				
	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰
Sucre disparu sur 21 gr. ‰ . .	14 [±] 0	19 [±] 0	19 [±] 0	21 [±] 0	17 [±] 0
Alcool	4 [°] 5	7 [°] 0	8 [°] 0	8 [°] 5	7 [°] 4
Poids de levures pour 100 cm ³ de mout.	0 [±] 130	0 [±] 140	0 [±] 127	0 [±] 125	0 [±] 207
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0,920	0,740	0,650	0,590	1,200
Acidité volatile, en acide acétique par litre.	1,12	1,50	1,01	1,12	1,17

Expérience avec la levure III.

	DOSES DE PHOSPHATE D'AMMONIUM				
	2 ‰	4 ‰	6 ‰	8 ‰	10 ‰
Sucre disparu sur 21 gr. ‰ . .	20 [±] 0	14 [±] 0	14 [±] 0	14 [±] 0	12 [±] 7
Alcool	7 [°] 0	5 [°] 0	5 [°] 0	5 [°] 0	4 [°] 5
Poids de levures pour 100 cm ³ de mout	0 [±] 132	0 [±] 098	0 [±] 080	0 [±] 080	0 [±] 150
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0,660	0,710	0,570	0,550	1,200
Acidité volatile, en acide acétique par litre.	1,10	1,35	2,17	2,14	2,13

Les résultats obtenus confirment les premiers. En effet, lorsque les quantités de phosphate d'ammonium croissent de 2 gr. à 8 gr. ‰, la levure I passe progressivement de 4[°],5 d'alcool à 8[°],5, tandis que la levure II décroît de 7[°] à 4[°],5.

Ces faits, en outre, spécifient d'une façon irréfutable ces deux levures et donnent encore une indication précieuse sur la dose de phosphate d'ammonium nécessaire et suffisante à chacune pour l'obtention de la meilleure fermentation.

On voit aussi que l'état de souffrance où se trouve la levure III en présence des fortes doses se traduit par la formation d'une grande quantité d'acides volatils.

Enfin, quand le phosphate d'ammonium est en proportion excessive pour la levure, il semble favoriser surtout sa vie végétale, au détriment de son activité comme ferment.

VI. — Influence sur la nutrition des levures des quantités comparatives de phosphate d'ammonium et de sucre contenus dans le liquide fermentant.

Partant de ces données, j'ai fait, de plus, une expérience complémentaire dont le sujet, du reste, avait déjà donné des résultats à MM. STERN¹ et THOMAS² dans leurs études sur la nutrition azotée de la levure.

Ces chimistes ont étudié, avec d'autres aliments azotés que le phosphate d'ammonium, l'influence que peuvent avoir sur la fermentation alcoolique les proportions réciproques des éléments azotés et hydrocarbonés. J'ai mis deux séries parallèles de fermentations avec 2, 4 et 8 gr. ‰ de phosphate d'ammonium en présence de 20 gr. ‰ de sucre pour la première, et de 24 gr. ‰ pour la seconde.

Expérience avec la levure I.

	2 GR. ‰ DE PHOSPHATE D'AMMONIUM		4 GR. ‰ DE PHOSPHATE D'AMMONIUM		6 GR. ‰ DE PHOSPHATE D'AMMONIUM	
	20 ‰	24 ‰	20 ‰	24 ‰	20 ‰	24 ‰
Sucre disparu	14 $\overline{80}$	11 $\overline{80}$	19 $\overline{80}$	14 $\overline{80}$	21 $\overline{80}$	15 $\overline{80}$
Alcool	4 $\overline{05}$	4 $\overline{00}$	7 $\overline{00}$	5 $\overline{00}$	8 $\overline{04}$	5 $\overline{05}$
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0 $\overline{8920}$	0 $\overline{8920}$	0 $\overline{8740}$	0 $\overline{8650}$	0 $\overline{8590}$	0 $\overline{8600}$
Acidité totale, en acide tartrique par litre . . .	3,7	4,0	5,2	4,8	7,2	6,3
Acidité volatile, en acide acétique par litre. . .	1,1	1,7	1,5	1,6	1,1	1,6

Expérience avec la levure III.

	2 GR. ‰ DE PHOSPHATE D'AMMONIUM		4 GR. ‰ DE PHOSPHATE D'AMMONIUM		6 GR. ‰ DE PHOSPHATE D'AMMONIUM	
	20 ‰	24 ‰	20 ‰	24 ‰	20 ‰	24 ‰
Sucre disparu	20 $\overline{80}$	16 $\overline{80}$	14 $\overline{80}$	11 $\overline{85}$	14 $\overline{80}$	13 $\overline{80}$
Alcool	7 $\overline{08}$	8 $\overline{00}$	5 $\overline{07}$	4 $\overline{00}$	5 $\overline{07}$	5 $\overline{00}$
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0 $\overline{8660}$	0 $\overline{8750}$	0 $\overline{8710}$	1 $\overline{8250}$	0 $\overline{8530}$	0 $\overline{8800}$
Acidité totale, en acide tartrique par litre . . .	3,9	4,0	5,4	4,0	7,9	6,0
Acidité volatile, en acide acétique par litre. . .	1,1	0,8	1,4	1,0	2,0	1,3

1. STERN : *J. of the chem. Soc.*, 1901, t. 79, p. 943.

2. THOMAS : *Ann. de la Brass. et de la Dist.*, 1902, t. 4, p. 367.

L'on voit, d'après ces tableaux, que la présence de quantités différentes de sucre donné comme aliment aux levures I et III, tout en ne changeant rien à leur faculté d'assimilation respective vis-à-vis du sel ammoniacal, a influencé les deux d'une façon uniforme. Toutes les deux, en effet, se montrent nettement gênées par la forte proportion d'aliment sucré.

Dans tous les cas, les quantités de saccharose disparu et d'alcool formé sont plus faibles lorsque le milieu renferme 24 gr. $\%$ de sucre. Autre indice : c'est le développement, dans ces conditions, de la levure végétal signalé par l'augmentation du poids de levure formé, et cela évidemment au détriment de la fonction ferment.

La levure I a tout particulièrement ressenti l'action néfaste de la trop grande richesse saccharine du moût, elle le traduit, entre autres signes, par la formation d'une acidité volatile élevée.

L'effet est peut-être moins marqué avec la levure III, qui se trouvait déjà gênée dans le cas de 20 gr. $\%$ de saccharose, par la progression de la dose de phosphate d'ammonium.

Quant au rendement en poids de la levure I, il ne paraît pas avoir été très modifié par un excès d'aliment sucré.

Pour la levure III, au contraire, il a été très sensiblement augmenté, et surtout avec 4 gr. $\%$ de sel ammoniacal.

Avec les deux levures, le chiffre de l'acidité suit la même courbe que celle des doses de phosphate d'ammonium ajouté.

VII. — Effet de la correction de l'acidité par la neutralisation du moût avec le carbonate d'ammonium.

A l'action spéciale du tartrate d'ammonium sur la levure, on peut rattacher quelques expériences sur la correction de l'acidité des moûts, question qui semble avoir une portée pratique, peut-être intéressante. Aussi, c'est surtout cette considération qui m'a servi de guide dans les essais suivants.

Quinze ballons partagés en trois séries et contenant tous la même quantité de moût stérile, provenant de raisins blancs champenois, ont étéensemencés avec les cinq levures. Cette opération a été effectuée au fil de platine, c'est-à-dire d'une façon rigoureusement uniforme, remarque sur laquelle j'ai déjà insisté.

La première série était constituée par des ballons contenant le moût naturel.

Dans la seconde et la troisième, chaque récipient fut additionné par 1.000 cm³ de moût de 20 gr. d'acide tartrique.

Puis, ceux de la troisième exclusivement reçurent du sesquicarbo-

nate d'ammonium, qui fut introduit aseptiquement et en quantité calculée pour neutraliser à peu près l'acide tartrique surajouté.

De ces différents traitements, il résulte que :

Le moût naturel avant fermentation titrait :

11 gr. ‰ d'acide tartrique et 160 gr. ‰ de sucre réducteur.

Le moût acidifié avant fermentation titrait :

(11 + 20) = 31 gr. ‰ d'acide tartrique et 160 gr. ‰ de sucre réducteur.

Le moût acidifié puis neutralisé avant fermentation titrait :

14 gr. ‰ d'acide tartrique et 160 ‰ de sucre réducteur.

1° Expérience avec le moût naturel.

Des quantités égales de moût de raisin, placées dans les mêmes conditions, ont étéensemencées avec les cinq levures.

L'expérience a donné les résultats suivants :

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 16 gr. ‰ . . .	15 ^s env.	15 ^s env.	15 ^s env.	15 ^s env.	15 ^s env.
Alcool.	8°	6°8	7°3	6°9	7°3
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	11 ^s 2	11 ^s 6	10 ^s	11 ^s 6	11°8

2° Expérience avec le moût très acide.

Des mêmes quantités du moût précédent ont été additionnées de 2 gr. ‰ d'acide tartrique,ensemencées et placées dans des conditions analogues à l'expérience précédente. Les résultats trouvés ont été les suivants :

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 16 gr. ‰ . . .	14 ^s env.	14 ^s env.	14 ^s env.	14 ^s env.	14 ^s env.
Alcool.	6°9	6°9	6°9	6°9	6°9
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	28 ^s 5	28 ^s 1	28 ^s 9	28 ^s 9	28 ^s 5

3° Expérience avec le moût partiellement neutralisé.

Les mêmes quantités de ce moût acidulé artificiellement ont été, avant ensemencement, neutralisées par des doses égales de carbonate d'ammonium. Toujours dans les mêmes conditions, les résultats des fermentations sont :

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 16 gr. % . . .	13°5 env.	13°5 env.	13°5 env.	13°5 env.	13°5 env.
Alcool	6°5	6°	6°8	6°3	6°5
Acidité totale, en acide tartrique par litre	12°8	15°	15°	14°3	14°6

Dans les trois séries, la fermentation est partie deux jours après l'ensemencement. Cependant, tandis qu'à ce moment les levures II et V sont en pleine activité, les levures I et III sont en retard sur les autres.

Dans le moût naturel, la fermentation est complète en huit jours, les levures III et V finissent d'abord, les levures II et IV terminent les dernières.

Par contre, dans le moût très acide, la fermentation, abondante après trois jours pour les levures II, IV et V, devient languissante pour toutes les levures après sept jours. Elle ne finit complètement qu'après quinze jours.

Dans le moût neutralisé, les levures III et V ne fermentent plus après six jours, les levures II et IV après huit jours et la levure I après neuf jours. Les dépôts contiennent de nombreux cristaux de tartrate acide d'ammonium, le liquide surnageant est plus foncé que celui du milieu précédent, lui-même, du reste, beaucoup plus coloré que le moût naturel fermenté.

Outre la constatation de la baisse de l'acidité du milieu neutralisé qui vient ainsi se niveler avec celle du moût naturel, l'allure générale des résultats fournis par cinq levures dans cette expérience, présente un parallélisme intéressant entre le milieu naturel et le milieu neutralisé.

Tandis que, dans le moût acide, les chiffres d'alcool sont semblables, que ceux de l'acidité n'offrent qu'un écart n'égayant pas l'unité, on trouve dans les deux autres milieux une variation de 1° environ pour l'alcool et une de 2 gr. d'acide tartrique par litre pour l'acidité. Les cinq levures ont donc retrouvé dans le moût neutralisé leur individualité. Ceci est encore plus probant si l'on considère les levures III et I en particulier.

La première a été reconnue précédemment pour se plaire de fortes doses de tartrate d'ammonium, aussi c'est elle qui a donné le plus d'alcool. La levure I au contraire, très sensible à un grand excès de ce sel, tombe en effet de 8° d'alcool à 6°3.

Autre preuve, c'est que l'acidité initiale du moût égale 11, on la trouve dans le vin oscillant entre 10 et 12.

Dans le moût neutralisé elle était de 14 et varie, après fermentation, entre 13 et 14, donnant ainsi les mêmes oscillations.

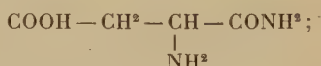
Quant aux levures II, IV et V, insensibles au tartrate d'ammonium, elles se replacent dans le moût neutralisé avec le même ordre où elles étaient dans le moût naturel.

VIII. — Action comparée de l'asparagine et de l'aspartate d'ammonium comme aliment azoté des levures.

Au sujet de l'asparagine, certains auteurs ont avancé qu'elle avait besoin d'être transformée à l'état d'aspartate d'ammonium pour être assimilée par la levure. C'est pourquoi j'ai fait une expérience comparative à ce propos en introduisant dans le milieu minéral la même quantité d'azote pris sous forme d'asparagine dans un cas et à l'état d'aspartate d'ammonium dans l'autre.

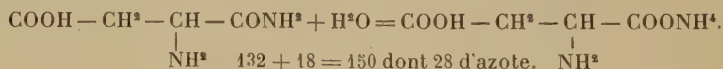
Ce sel n'existant pas dans le commerce, je l'ai obtenu pour mes expériences en utilisant une des propriétés chimiques de l'asparagine.

Ce dernier composé étant l'amide de l'acide amino-succinique, sa formule est dès lors :



son poids moléculaire vaut 132, dont 28 d'azote.

Or, l'asparagine chauffée à 120° en ballon scellé, pendant une demi-heure, se transforme en aspartate d'ammonium suivant l'équation :



L'on voit donc que la quantité d'asparagine correspondante en azote à 0 gr. 70 d'aspartate d'ammonium est de 0 gr. 62. Chaque ballon contenant 100 cm³ de milieu minéral, a dès lors reçu pour ceux de la série asparagine 10 cm³ d'une solution stérilisée à 6 gr. 2 ‰.

Ceux de la série aspartate ont été additionnés de 10 cm³ d'une solution à 7 gr. ‰ de ce sel obtenu par chauffage à 120° en ballon scellé de 6 gr. 20 d'asparagine anhydre dissoute dans l'eau, en quantité suffisante pour obtenir 100 cm³ de liquide.

Dans les deux séries, la levure IV et la levure V ont fermenté les premières en donnant une mousse abondante; la levure III est partie la dernière et a manifesté la plus faible activité.

L'asparagine a une influence très nette sur l'aspect des dépôts de levures. Il se produit une action agglutinante qui se traduit par la

production de dépôts grumeleux avec les levures I, III, IV, V et par un empâtement du dépôt formé par la levure II.

Mais, tandis que les levures I, III, IV donnent des grumeaux très mobiles, ceux de la levure V sont très adhérents au verre.

Expérience avec l'asparagine.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. % . .	18±0	21±0	17±0	20±0	22,0
Alcool.	7°1	9°5	7°0	7°5	9°5
Poids de levures pour 100 cm ³ de moût	0±120	0±113	0±095	0±095	0,153
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0,700	0,550	0,550	0,500	0,700
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	4,2	4,0	3,0	5,0	4,0
Acidité volatile, en acide acé- tique par litre.	1,2	1,6	1,5	2,7	1,6

Expérience sur l'aspartate d'ammonium.

	LEVURE I	LEVURE II	LEVURE III	LEVURE IV	LEVURE V
Sucre disparu sur 22 gr. % . .	16±0	20±5	14±0	21±0	20±5
Alcool.	5°5	7°0	4°5	8°0	7°0
Poids de levures pour 100 cm ³ de moût	0±112	0±100	0,087	0±095	0,115
Poids de levures pour 100 gr. de sucre disparu	0,700	0,500	0,600	0,450	0,550
Acidité totale, en acide tartrique par litre.	4,0	4,25	3,5	5,0	4,25
Acidité volatile, en acidité acé- tique par litre	1,5	1,6	1,3	2,9	1,6

Avec l'asparagine, la levure II, la levure V, la levure IV, faisant disparaître 20 % de sucre ont donc donné une bonne fermentation fournissant pour les deux premières 9°5 d'alcool. La troisième se singularise encore par une forte proportion d'acides volatils.

Tandis que la multiplication des levures II, III, IV est à peu près la même, les levures I et V ont produit un poids de levures beaucoup plus fort.

Avec l'aspartate, ce sont encore les trois mêmes levures qui ont utilisé une même et plus grande quantité de sucre.

Les titres alcooliques invariables pour la levure IV sont cependant

plus faibles pour les deux autres. Les poids de levures sont représentés à peu près par les mêmes chiffres.

L'acidité volatile de la levure IV est aussi élevée qu'avec l'asparagine.

Aussi, ce composé semble préférable aux quatre autres levures, au point de vue des résultats de la fermentation. Il y a départ de sucre plus grand, formation d'alcool plus forte, rendement de levures presque égal et diminution importante de l'acidité.

La levure III est celle qui paraît le moins bien se plaire en milieu minéral avec asparagine ou aspartate d'ammonium comme aliment azoté et tout particulièrement avec ce dernier.

On peut conclure de cette expérience que l'asparagine favorisant davantage la levure que l'aspartate, est dès lors plus assimilable, et que ce sel n'est donc pas la forme de passage nécessaire à cette amide pour son absorption.

CHAPITRE IV

CONSIDÉRATIONS PRATIQUES TIRÉES DES FAITS PRÉCÉDENTS

Dans la quatrième partie de ce travail, j'ai cherché à tirer des données précédentes et purement scientifiques quelques idées d'ordre exclusivement pratique ayant rapport aux fermentations alcooliques en général et à la manutention des vins de Champagne en particulier.

Toutefois, auparavant, il n'est peut-être pas superflu de rappeler brièvement en les résumant le plus possible les phases successives par lesquelles du raisin on arrive au vin mousseux de Champagne, dont la renommée est si universelle.

I. — Exposé de la vinification et de la manutention des vins mousseux de Champagne.

Tandis que l'apparition de la vigne en Champagne et la production du vin remonte à une très haute antiquité, époque de l'empereur romain Domitien et de l'archevêque rémois saint Remi, l'utilisation de la lenteur de la fermentation de ce vin ne date que du ^{xvii}^e siècle. A cette époque, le moine Dom Perignon profite de ce pétilllement naturel pour faire acquérir aux vins de la Champagne une réputation qui ne cessa de s'accroître.

C'est en 1833 que le pharmacien FRANÇOIS, mesurant et dosant avec précision les éléments du vin, assura d'une façon rationnelle les résultats de la fabrication, jusque-là très incertains et peu rémunérateurs.

Cette date marque l'événement scientifique le plus considérable de toute l'histoire de la manutention du vin de Champagne. D'autres chimistes, et tout particulièrement CORDIER et MANCEAU, ont, depuis, étudié certains points relatifs aux si nombreuses et combien délicates manipulations que l'on doit faire subir à ce vin.

Et cependant, il faut encore convenir avec M. R. DE LA MORINERIE, qui disait encore tout récemment (Reims, Congrès 1907) que la technique des vins de Champagne, bien que faisant des progrès constants, est restée très empirique jusque dans ces derniers temps.

Voici, résumées en quelques mots, les grandes phases de la manutention :

Opérations de la vendange :

Soins excessivement méticuleux en tout.

Cueillette à maturité exacte.

Triage minutieux de chaque grappe.

Pressurage rapide et très faible pour l'obtention d'un moût très pur et très riche (vin de cuvée).

Obtention du vin en cercle :

• Premier soutirage dès la fin de la fermentation principale du premier bouillonnement.

Deuxième et troisième soutirage à époques déterminées, puis tannage et collage.

Assemblage, c'est-à-dire faire le mélange judicieux des vins de différents crus.

Prise en mousse :

Seconde fermentation qui donne au vin son gaz, par suite de la production d'une certaine quantité d'anhydride carbonique (5 à 6 atmosphères) résultant de la fermentation en bouteille du vin précédent. On augmente la petite quantité de sucre restant par l'addition exactement calculée d'une certaine dose de liqueur de tirage (sucre candi dissous dans du vieux vin blanc).

Manutention finale du vin en bouteille :

Mise sur pointe, remuage et dégorgement pour éliminer le dépôt de levure formé et ainsi éclaircir complètement et parfaitement le vin.

DOSAGE. — Aussitôt que le vin a été dégorgé, sa pression de gaz carbonique tombe et reste à 3 atmosphères environ. Avant le bouchage définitif de la bouteille, quand le vin est alors prêt à être consommé, on l'additionne d'une nouvelle quantité de sucre (liqueur d'expédition) variable suivant les types de goûts commerciaux à obtenir (goût français, goût américain, goût anglais).

II. — Considérations diverses d'ordre essentiellement pratique.

Il serait logique de suivre dans les plus petits détails ces diverses opérations, et voir s'il n'y aurait pas pour l'une ou l'autre une adaptation quelconque des données théoriques acquises par les expériences précédentes.

C'est là un champ d'expériences combien vaste et non moins aride réservé pour des travaux futurs. Aussi, pour l'instant, je ne ferai qu'indiquer dans les quelques lignes qui suivent, quelques-unes des principales idées conçues dans cet ordre et à ce sujet.

Il semble que l'emploi d'une seule race de levure sélectionnée soit préférable à celui d'un mélange de levures. Dans une vinification, on peut ainsi prévoir d'une façon beaucoup plus certaine le résultat de la fermentation et faire ensuite un mélange judicieux des vins obtenus.

Il est indiqué de mettre à profit certaines propriétés spécifiques à chaque levure dans un but déterminé. Par exemple, l'utilisation de la levure V dans la prise de mousse, en raison de sa grande activité et surtout de la forme du dépôt en grumeaux. Si l'on vise surtout ce dernier but, la levure III donnant un dépôt très compact et très mobile sera aussi particulièrement indiquée. Par contre, les levures IV et II ne seront dès lors jamais utilisées pour cette seconde fermentation du vin de Champagne et le seront encore moins en raison de leur faible résistance à l'alcool.

Il doit être prudent de favoriser le développement rapide et actif de certaines levures à lévulose dans la fermentation de certains moûts, reconnus comme fournissant des vins susceptibles d'être infectés par certains microorganismes avides de ce sucre, le microbe de la graisse par exemple.

S'inspirant de principes analogues, il faut employer de préférence des levures très résistantes à l'acidité dans les années où, par suite de maturité incomplète du raisin, l'acidité du moût est élevée, ou tout au moins faire une association de levures, d'où pourront résulter les plus heureux effets au point de vue de la qualité des vins.

Les expériences précédentes montrent nettement, lorsque l'on utilise des moûts de provenance étrangère à la Champagne pour les faire fermenter avec des levures champenoises, que celles-ci ne sont pas placées dans leurs éléments (réaction, présence du calcium liée à la nature du sol, température septentrionale). Elles se trouvent ainsi dans de mauvaises conditions qui ne permettent pas d'espérer les résultats attendus.

Si l'on veut considérer l'influence si importante de la nutrition

zotée sur la production d'alcools supérieurs et la formation de zymase, il est peut-être possible d'arriver à régler jusqu'à un certain point l'allure de la fermentation par l'analyse quantitative et qualitative des matériaux azotés des moûts.

Une autre considération, qui a une répercussion directe et considérable sur la pratique vinicole, se rapporte à l'emploi du phosphate d'ammonium. Son emploi si répandu dans la pratique œnologique devra toujours être fait avec prudence et circonspection, attendu qu'il est très différemment utilisé par les diverses levures.

Peut-être pourrait-il être avantageusement remplacé comme accélérateur de la fermentation par une forme azotée organique de nature amidée, aliment privilégié et favorable aux levures : asparagine, aspartate d'ammonium.

Il est possible d'utiliser pratiquement l'action spéciale variable et caractéristique des divers éléments azotés et des différents sels d'ammonium sur l'un ou l'autre des deux états vitaux de la levure, levure végétal et levure ferment.

Enfin on voit qu'il est de toute nécessité de connaître la physiologie propre des diverses levures. Ces végétaux, en effet, se comportent d'une façon toute différente devant les divers aliments azotés. Eux-mêmes, du reste, doivent leur être présentés le plus souvent suivant une dose optima, qui règle la vitesse de fermentation par exemple. Ailleurs, la qualité peut contribuer à la forme des dépôts et à la coloration plus ou moins foncée des moûts fermentés.

L'ensemble de ces considérations montre, à côté de l'intérêt énorme que peut en tirer le viticulteur ou l'industriel, toute la circonspection qu'il doit mettre dans le choix et l'emploi des levures sélectionnées. Si elles constituent, en effet, un moyen puissant et incontestablement remarquable de réussite, elles peuvent devenir des agents dangereux et mêmes néfastes.

Elles ne devront être appliquées, d'une façon générale, qu'après un contrôle vigoureux et scientifique de leur origine; de leur pureté et de leur spécificité et après l'examen analytique et raisonné des milieux qu'elles devront transformer.

Pour les moûts de raisin par exemple, au moment de la fermentation, les renseignements utiles à connaître ne devront pas se borner à en déterminer simplement la richesse saccharine. C'est là un milieu de nature essentiellement biologique, dans lequel l'analyse devra déterminer le plus possible au sujet de sa composition et tout particulièrement aux points de vue éléments hydrocarbonés, éléments azotés, éléments minéraux, teneur acidimétrique.

Ce sont là évidemment des complications de manutention peu à la portée du simple vigneron, déjà si réfractaire à toute innovation.

Tout au contraire, pour le viticulteur ou industriel raisonné, ces

faits, comme du reste beaucoup d'autres sur lesquels je ne puis insister sans sortir de mon sujet, concourent à rendre indispensable la création de *vineries* modernes. Cette idée prend corps tous les jours davantage, et à ce sujet le Champagne vinicole n'est pas en retard sur les autres régions, mais il faut alors que ces vineries soient vraiment des usines perfectionnées, possédant à côté du service commercial et de celui de la manutention, celui du laboratoire à la fois chimique et biologique.

A notre époque où tout s'industrialise scientifiquement, les nombreuses branches de l'industrie des fermentations, quittant les pratiques ténébreuses de l'empirisme, doivent entrer résolument dans la voie féconde du progrès, d'où sa prospérité triomphante sortira.

CONCLUSIONS

Pour adopter le même ordre que celui que j'ai suivi dans l'exposé de mes recherches, les principales conclusions qui en ressortent sont les suivantes :

1° Il existe dans le vignoble de Champagne des espèces de levures œnogènes complètement distinctes les unes des autres. Elles se différencient, non seulement par leurs caractères morphologiques, mais surtout par leurs propriétés biologiques ;

2° L'examen microscopique de la forme des globules de levures de vin pourra contribuer à une différenciation assez certaine des espèces, quand il sera effectué dans d'autres milieux que le moût de raisin, le bouillon de touraillon par exemple, et dans certaines conditions : cultures préalablement rajeunies, examen dès que la fermentation devient active à la température de 25° environ ;

3° L'étude de la nutrition hydrocarbonée et azotée des levures et de leur physiologie permet d'établir, d'une façon générale et constante, qu'elles ont chacune un organisme différent. Tandis que les levures I et III se comportent comme ayant un tempérament très délicat, d'autres, comme les levures II, V et surtout IV, en possèdent un facile et robuste ;

4° L'eau oxygénée, introduite dans le moût de raisin à faible dose ne tue pas spontanément les levures qu'il renferme, elle retarde seulement leur développement ; 2 centimètres cubes par litre occasionnent un retard de cinq jours environ à la température de 25°. Pour les levures en pleine activité, celles qui sont le plus sensibles à cet antiseptique, il en faut 30 centimètres cubes environ par litre pour arrêter la fermentation ;

5° L'azote ammoniacal, pris sous forme de carbonate d'ammonium, employé toutefois avec certaines précautions opératoires, peut servir à la nutrition azotée des levures de vins tout aussi bien que l'azote

amidé et l'azote albuminoïde. Ce sel, associé aux autres aliments nécessaires aux levures, permet de constituer un milieu artificiel très simple, exclusivement minéral et chimiquement défini avec lequel on pourra obtenir, même avec un très faible ensemencement, non seulement des cultures de levures de vins, mais aussi d'excellentes fermentations alcooliques donnant un départ de près de 20 gr. % de sucre réducteur;

6° La nutrition azotée des levures de Champagne est la même que celles des levures de bière et des levures alcooliques en général. Le maximum d'activité est obtenu avec la peptone, qui favorise en même temps leur multiplication et produit des fermentations donnant très peu d'acides volatils.

Dans cette question d'alimentation azotée, la nature de la levure mise en travail intervient comme facteur important, tout particulièrement avec l'aliment asparagine qui, pas plus que l'azote ammoniacal, ne contribue au développement des levures. Par contre, leur multiplication est considérablement exaltée avec l'azote nitrique qui est aussi défavorable aux fermentations des levures de vin qu'à celles des levures de bière;

7° Pour une source azotée ammoniacale prise sous forme d'un sel d'ammonium, l'acide qui est combiné à ce métal intervient dans l'assimilation qu'en font les levures. En second lieu, les doses des différents sels d'ammoniaque absorbés par les levures qui en tirent leur activité en tant que végétal ou ferment, non seulement diffèrent avec les divers sels, mais varient avec chaque levure.

D'une façon générale cependant, tandis que l'aspartate d'ammonium constitue un excellent aliment pour les levures, l'azotate et le chlorure à doses élevées sont pour toutes nettement défavorables;

8° Le phosphate d'ammonium est particulièrement celui des sels ammoniacaux qui présente une dose optima d'assimilation vis-à-vis des certaines levures, comme les levures I et III qui, selon les quantités plus ou moins grandes de ce composé qu'elles trouvent à leur disposition, donnent des résultats très différents;

9° Les levures de vin se comportant ainsi comme les levures de bière, provoquent de moins bonnes fermentations quand elles sont en présence de trop grandes quantités réciproques de matériaux azotés et hydrocarbonés.

Une trop forte proportion de sucre dans les moûts gêne l'activité des levures de Champagne;

10° L'emploi du carbonate d'ammonium pour neutraliser une acidité

des moûts nuisible au bon fonctionnement des levures alcooliques, leur permet de retrouver leurs aptitudes normales comme ferments;

11° L'asparagine, dont l'influence sur la prise en grumeaux des dépôts des levures est très nette, donnant de meilleures fermentations que des doses exactement correspondantes en azote d'aspartate d'ammonium, la levure peut donc l'assimiler directement sans sa transformation préalable en ce sel;

12° A la plupart des données acquises au cours de ces expériences purement théoriques se rattache une application directe ayant un intérêt immédiat dans la pratique vinicole et plus particulièrement sur celle si spéciale des vins mousseux de Champagne.

VU, BON A IMPRIMER :

Le Président de Thèse,
RADAIS.

VU :

Le Directeur de l'École,
GUIGNARD.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
L. LIARD.

